

日 本 国 特 許 庁  
JAPAN PATENT OFFICE

11.04.03

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office

出 願 年 月 日

Date of Application:

2002年 4月11日

出 願 番 号

Application Number:

特願2002-109734

[ ST.10/C ]:

[ JP 2002-109734 ]

出 願 人

Applicant(s):

持田製薬株式会社

REC'D 06 JUN 2003

WIPO PCT

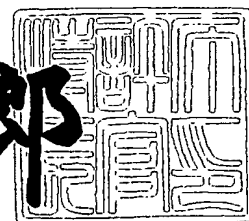
PRIORITY DOCUMENT  
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH  
RULE 17.1(a) OR (b)

BEST AVAILABLE COPY

2003年 5月20日

特 許 庁 長 官  
Commissioner,  
Japan Patent Office

太田信一郎



出証番号 出証特2003-3036716

【書類名】 特許願

【整理番号】 MD0623

【提出日】 平成14年 4月11日

【あて先】 特許庁長官 殿

【国際特許分類】 C07K 7/00  
C07H 21/00  
A61K 38/00

【発明者】

【住所又は居所】 東京都新宿区四谷一丁目7番地 持田製薬株式会社内

【氏名】 田口 泰

【発明者】

【住所又は居所】 東京都新宿区四谷一丁目7番地 持田製薬株式会社内

【氏名】 土師 京介

【特許出願人】

【識別番号】 000181147

【氏名又は名称】 持田製薬株式会社

【代理人】

【識別番号】 100080159

【弁理士】

【氏名又は名称】 渡辺 望稔

【電話番号】 3864-4498

【選任した代理人】

【識別番号】 100090217

【弁理士】

【氏名又は名称】 三和 晴子

【電話番号】 3864-4498

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 006910

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【包括委任状番号】 9715033

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 ポリエチレングリコール化学修飾ペプチド

【特許請求の範囲】

【請求項1】

18アミノ酸からなる配列を含む、ポリエチレングリコール（PEG）化学修飾ペプチドであって、

前記18アミノ酸からなる配列が、エドモンソン・ホイール・プロット法による $\alpha$ -ヘリックス構造モデルにおいて、交互に配置された二つの疎水面と二つの親水面の4つの面から構成され、

前記疎水面の1つが5～7アミノ酸から構成され、かつ疎水性アミノ酸の構成比率が80モル%以上であり、

前記親水面の1つが5～6アミノ酸から構成され、かつ親水性アミノ酸の構成比率が80モル%以上であって、かつアルギニン又はリジンから選ばれるアミノ酸の構成比率が50モル%以上であり、

前記疎水面の別の1つが2～4疎水性アミノ酸から構成され、

前記親水面の別の1つが3～5アミノ酸から構成され、かつ親水性アミノ酸の構成比率が80モル%以上である、PEG化学修飾ペプチド。

【請求項2】

全アミノ酸数が20以上であって、両端がN末端及びC末端であり、両端のアミノ酸を除いた任意の連続した18アミノ酸が、前記18アミノ酸からなる配列を示す請求項1に記載のPEG化学修飾ペプチド。

【請求項3】

N末端及びC末端のアミノ酸が親水性アミノ酸である請求項1又は2に記載のPEG化学修飾ペプチド。

【請求項4】

前記18アミノ酸からなる配列が下記のアミノ酸配列の中の任意の連続した18アミノ酸配列である請求項1～3のいずれかに記載のPEG化学修飾ペプチド

X2-X3-X4-X5-X6-X7-X8-X9-X10 -X11 -X12 -X13 -X14 -X15 -X16 -X17 -X18 -X

19 -X20 -X21 -X22 -X23 -X24 -X25 -X26 -X27 -X28 -X29 -X30 -X31 -X32 -X33  
-X34 -X35 -X36

但し、

「X4、X8、X11、X15、及びX19」、「X8、X11、X15、X19、及びX22」、  
「X11、X15、X19、X22、及びX26」、「X15、X19、X22、X26、及びX29」、  
並びに「X19、X22、X26、X29、及びX33」において、それぞれ5アミノ  
酸中、4アミノ酸以上は疎水性アミノ酸であり、

X3、X10、X12、X21、X28、及びX30はそれぞれ疎水性アミノ酸、中性親水  
性アミノ酸又は塩基性親水性アミノ酸のいずれかであり、

「X2、X5、X9、X13、及びX16」、「X5、X9、X13、X16、及びX20」、  
「X9、X13、X16、X20、及びX23」、「X13、X16、X20、X23、及びX27」、  
「X16、X20、X23、X27、及びX31」、並びに「X20、X23、X27、X31、  
及びX34」において、それぞれ5アミノ酸中、4アミノ酸以上は中性親水性アミ  
ノ酸又は塩基性親水性アミノ酸であり、かつそのうち少なくとも3アミノ酸はアル  
ギニン又はリジンであり、

X6、X17、X24、及びX35はそれぞれ疎水性アミノ酸であり、

X7、X14、X18、X25、X32、及びX36はそれぞれ中性親水性アミノ酸又は塩  
基性親水性アミノ酸である。

# 【請求項5】

前記18アミノ酸からなる配列を含む、PEG化学修飾ペプチドのペプチド部  
分が、下記のアミノ酸配列からなる請求項1～4のいずれかに記載のPEG化学  
修飾ペプチド。

X1-X2-X3-X4-X5-X6-X7-X8-X9-X10 -X11 -X12 -X13 -X14 -X15 -X16 -X17 -X18  
-X19 -X20 -X21 -X22 -X23 -X24 -X25 -X26 -X27 -X28 -X29 -X30 -X31 -X32 -  
X33 -X34 -X35 -X36 -X37

但し、

X1及びX37は親水性アミノ酸であり、

「X4、X8、X11、X15、及びX19」、「X8、X11、X15、X19、及びX22」、  
「X11、X15、X19、X22、及びX26」、「X15、X19、X22、X26、及びX29」

」、並びに「X19、X22、X26、X29、及びX33」において、それぞれ5アミノ酸中、4アミノ酸以上は疎水性アミノ酸であり、

X3、X10、X12、X21、X28 及びX30 はそれぞれ疎水性アミノ酸、中性親水性アミノ酸又は塩基性親水性アミノ酸のいずれかであり、

「X2、X5、X9、X13、及びX16」、「X5、X9、X13、X16、及びX20」、「X9、X13、X16、X20、及びX23」、「X13、X16、X20、X23、及びX27」、「X16、X20、X23、X27、及びX31」、並びに「X20、X23、X27、X31、及びX34」において、それぞれ5アミノ酸中、4アミノ酸以上は中性親水性アミノ酸又は塩基性親水性アミノ酸であり、かつ、そのうち少なくとも3アミノ酸はアルギニン又はリジンであり、

X6、X17、X24、及びX35 はそれぞれ疎水性アミノ酸であり、

X7、X14、X18、X25、X32、及びX36 はそれぞれ中性親水性アミノ酸又は塩基性親水性アミノ酸である。

なお、X2からX36 までのアミノ酸は少なくとも連続して18アミノ酸が保存される限りアミノ酸が欠失、付加、挿入又は置換されてもよい。

#### 【請求項6】

前記X1～X37 が下記のアミノ酸である請求項5に記載のPEG化学修飾ペプチド。

X1はトレオニンであり、

X37 はセリンであり、

X2、X5、X9、X20、X23、及びX27 はそれぞれアルギニン又はリジンであり、

X3及びX21 はそれぞれチロシン、フェニルアラニン、セリン又はアルギニンのいずれかであり、

X4、X17、X22、及びX35 はそれぞれロイシンであり、

X6、X15、X24、及びX33 はそれぞれロイシン又はイソロイシンであり、

X7、X13、X25、及びX31 はそれぞれヒスチジン又はアルギニンであり、

X8及びX26 はそれぞれプロリンであり、

X10 及びX28 はそれぞれセリン、アルギニン又はロイシンのいずれかであり、

X11 及びX29 はそれぞれトリプトファン又はロイシンであり、

X12 及びX30 はそれぞれバリン、ロイシン又はセリンのいずれかであり、  
X14 及びX32 はそれぞれグルタミン、アスパラギン又はアルギニンのいずれかであり、

X16 及びX34 はそれぞれアラニン又はアルギニンであり、  
X18 はアルギニン、リジン又はセリンのいずれかであり、  
X19 はロイシン又はトレオニンであり、  
X36 はアルギニン又はセリンである。

なお、X2からX36 までのアミノ酸は少なくとも連続して18アミノ酸が保存される限りアミノ酸が欠失、付加、挿入又は置換されてもよい。

【請求項7】

前記18アミノ酸からなる配列を含む、PEG化学修飾ペプチドのペプチド部分が、配列番号1～24のいずれかのアミノ酸配列からなる、請求項1～6のいずれかに記載のPEG化学修飾ペプチド。

【請求項8】

前記18アミノ酸からなる配列を含む、PEG化学修飾ペプチドのペプチド部分が、配列番号16又は19のアミノ酸配列からなる請求項1～6のいずれかに記載のPEG化学修飾ペプチド。

【請求項9】

前記18アミノ酸からなる配列を含む、PEG化学修飾ペプチドのPEG部分の分子量が、約200Da～約100,000Daである請求項1～8のいずれかに記載のPEG化学修飾ペプチド。

【請求項10】

以下の18アミノ酸からなる配列を含むPEG化学修飾ペプチド、及び、ペプチドと結合する物質を含有する複合体であって、

前記18アミノ酸からなる配列が、エドモンソン・ホイール・プロット法による $\alpha$ -ヘリックス構造モデルにおいて、交互に配置された二つの疎水面と二つの親水面の4つの面から構成され、

前記疎水面の1つが5～7アミノ酸から構成され、かつ疎水性アミノ酸の構成比率が80モル%以上であり、

前記親水面の 1 つが 5 ～ 6 アミノ酸から構成され、かつ親水性アミノ酸の構成比率が 80 モル%以上であって、かつアルギニン又はリジンから選ばれるアミノ酸の構成比率が 50 モル%以上であり、

前記疎水面の別の 1 つが 2 ～ 4 疎水性アミノ酸から構成され、

前記親水面の別の 1 つが 3 ～ 5 アミノ酸から構成され、かつ親水性アミノ酸の構成比率が 80 モル%以上である複合体。

【請求項 11】

全アミノ酸数が 20 以上であって、両端が N 末端及び C 末端であり、両端のアミノ酸を除いた任意の連続した 18 アミノ酸が、前記 18 アミノ酸からなる配列を示す請求項 10 に記載の複合体。

【請求項 12】

N 末端及び C 末端のアミノ酸が親水性アミノ酸である請求項 10 又は 11 に記載の複合体。

【請求項 13】

前記 18 アミノ酸からなる配列が下記のアミノ酸配列の中の任意の連続した 18 アミノ酸配列である請求項 10 ～ 12 のいずれかに記載の複合体。

X2-X3-X4-X5-X6-X7-X8-X9-X10 -X11 -X12 -X13 -X14 -X15 -X16 -X17 -X18 -X19 -X20 -X21 -X22 -X23 -X24 -X25 -X26 -X27 -X28 -X29 -X30 -X31 -X32 -X33 -X34 -X35 -X36

但し、

「X4、X8、X11、X15、及びX19」、「X8、X11、X15、X19、及びX22」、「X11、X15、X19、X22、及びX26」、「X15、X19、X22、X26、及びX29」、並びに「X19、X22、X26、X29、及びX33」において、それぞれ 5 アミノ酸中、4 アミノ酸以上は疎水性アミノ酸であり、

X3、X10、X12、X21、X28、及びX30 はそれぞれ疎水性アミノ酸、中性親水性アミノ酸又は塩基性親水性アミノ酸のいずれかであり、

「X2、X5、X9、X13、及びX16」、「X5、X9、X13、X16、及びX20」、「X9、X13、X16、X20、及びX23」、「X13、X16、X20、X23、及びX27」、「X16、X20、X23、X27、及びX31」、並びに「X20、X23、X27、X31、



及びX34」において、それぞれ5アミノ酸中、4アミノ酸以上は中性親水性アミノ酸又は塩基性親水性アミノ酸であり、かつそのうち少なくとも3アミノ酸はアルギニン又はリジンであり、

X6、X17、X24、及びX35はそれぞれ疎水性アミノ酸であり、

X7、X14、X18、X25、X32、及びX36はそれぞれ中性親水性アミノ酸又は塩基性親水性アミノ酸である。

【請求項14】

前記18アミノ酸からなる配列を含む、PEG化学修飾ペプチドのペプチド部分が、下記のアミノ酸配列からなる請求項10～13のいずれかに記載の複合体

X1-X2-X3-X4-X5-X6-X7-X8-X9-X10-X11-X12-X13-X14-X15-X16-X17-X18-X19-X20-X21-X22-X23-X24-X25-X26-X27-X28-X29-X30-X31-X32-X33-X34-X35-X36-X37

但し、

X1及びX37は親水性アミノ酸であり、

「X4、X8、X11、X15、及びX19」、「X8、X11、X15、X19、及びX22」、「X11、X15、X19、X22、及びX26」、「X15、X19、X22、X26、及びX29」、並びに「X19、X22、X26、X29、及びX33」において、それぞれ5アミノ酸中、4アミノ酸以上は疎水性アミノ酸であり、

X3、X10、X12、X21、X28及びX30はそれぞれ疎水性アミノ酸、中性親水性アミノ酸又は塩基性親水性アミノ酸のいずれかであり、

「X2、X5、X9、X13、及びX16」、「X5、X9、X13、X16、及びX20」、「X9、X13、X16、X20、及びX23」、「X13、X16、X20、X23、及びX27」、「X16、X20、X23、X27、及びX31」、並びに「X20、X23、X27、X31、及びX34」において、それぞれ5アミノ酸中、4アミノ酸以上は中性親水性アミノ酸又は塩基性親水性アミノ酸であり、かつ、そのうち少なくとも3アミノ酸はアルギニン又はリジンであり、

X6、X17、X24、及びX35はそれぞれ疎水性アミノ酸であり、

X7、X14、X18、X25、X32、及びX36はそれぞれ中性親水性アミノ酸又は塩

基性親水性アミノ酸である。

なお、X2からX36 までのアミノ酸は少なくとも連続して18アミノ酸が保存される限りアミノ酸が欠失、付加、挿入又は置換されてもよい。

【請求項15】

前記X1～X37 が下記のアミノ酸である請求項14に記載の複合体。

X1はトレオニンであり、

X37 はセリンであり、

X2、X5、X9、X20、X23、及びX27 はそれぞれアルギニン又はリジンであり、  
X3及びX21 はそれぞれチロシン、フェニルアラニン、セリン又はアルギニンのいずれかであり、

X4、X17、X22、及びX35 はそれぞれロイシンであり、

X6、X15、X24、及びX33 はそれぞれロイシン又はイソロイシンであり、

X7、X13、X25、及びX31 はそれぞれヒスチジン又はアルギニンであり、

X8及びX26 はそれぞれプロリンであり、

X10 及びX28 はそれぞれセリン、アルギニン又はロイシンのいずれかであり、

X11 及びX29 はそれぞれトリプトファン又はロイシンであり、

X12 及びX30 はそれぞれバリン、ロイシン又はセリンのいずれかであり、

X14 及びX32 はそれぞれグルタミン、アスパラギン又はアルギニンのいずれかであり、

X16 及びX34 はそれぞれアラニン又はアルギニンであり、

X18 はアルギニン、リジン又はセリンのいずれかであり、

X19 はロイシン又はトレオニンであり、

X36 はアルギニン又はセリンである。

なお、X2からX36 までのアミノ酸は少なくとも連続して18アミノ酸が保存される限りアミノ酸が欠失、付加、挿入又は置換されてもよい。

【請求項16】

前記18アミノ酸からなる配列を含む、PEG化学修飾ペプチドのペプチド部分が、配列番号1～24のいずれかのアミノ酸配列を含む、請求項10～15のいずれかに記載の複合体。

【請求項 1 7】

前記 1 8 アミノ酸からなる配列を含む、PEG 化学修飾ペプチドのペプチド部分が、配列番号 1 6 又は 1 9 のアミノ酸配列を含む請求項 1 0 ～ 1 5 のいずれかに記載の複合体。

【請求項 1 8】

ペプチドと結合する物質が核酸である、請求項 1 0 ～ 1 7 のいずれかに記載の複合体。

【請求項 1 9】

前記 1 8 アミノ酸からなる配列を含む、PEG 化学修飾ペプチドの PEG 部分の分子量が、約 2 0 0 D a ～ 約 1 0 0, 0 0 0 D a である請求項 1 0 ～ 1 8 のいずれかに記載の複合体。

【請求項 2 0】

1 8 アミノ酸からなる配列を含むペプチドと活性化ポリエチレングリコールとを反応させる、請求項 1 ～ 9 のいずれかに記載の PEG 化学修飾ペプチドの製造方法。

【請求項 2 1】

請求項 2 0 の方法により製造される、ポリエチレングリコール (PEG) により化学修飾されたペプチド。

【請求項 2 2】

a) 1 8 アミノ酸からなる配列を含むペプチドと、活性化ポリエチレングリコール (PEG) とを反応させる工程、

b) 前記 a) により得られる PEG 化学修飾ペプチドと、ペプチドと結合する物質とを反応させる工程、

よりなる、請求項 1 0 ～ 1 9 のいずれかに記載の複合体の製造方法。

【請求項 2 3】

a) 1 8 アミノ酸からなる配列を含むペプチドと、ペプチドと結合する物質とを反応させる工程、

b) 前記ペプチドと前記ペプチドと結合する物質との反応物を、活性化ポリエチレングリコール (PEG) と反応させる工程、

よりなる、請求項 1 0 ～ 1 9 のいずれかに記載の複合体の製造方法。

【請求項 2 4】

請求項 2 2 又は 2 3 の方法により製造される、ポリエチレングリコール（P E G）により化学修飾されている P E G 化学修飾ペプチドとペプチドと結合する物質との複合体。

【発明の詳細な説明】

【0 0 0 1】

【発明の属する技術分野】

本発明は、エドモンソン・ホイール・プロット法による  $\alpha$ -ヘリックス構造モデルにおいて、交互に配置された 2 つの疎水面と 2 つの親水面とで構成され、2 つの親水面のうち少なくとも 1 つの面が正荷電面である、1 8 アミノ酸からなる配列を含む、ポリエチレングリコール（以下「P E G」と略記する）により化学修飾されたペプチド（本明細書において、「P E G 化学修飾ペプチド」と略記する）、及び、その製造方法に関する。

また、本発明は、P E G 化学修飾ペプチドと、ペプチドと結合する物質との複合体、及び、その製造方法に関する。

【0 0 0 2】

【従来の技術】

病原微生物、病原性ウイルスやヒトの全遺伝子配列が解明されつつある今日、得られた遺伝情報を基に疾患の治療を行う試みが盛んに為されるようになり、そのひとつとして、DNA や RNA 及びこれらの誘導体、修飾体や改変体、いわゆる核酸を体内に投与する治療法が試みられている。これは、核酸を体内に投与することによって特定の遺伝子の発現量や特定の生理活性因子の機能発現を増減させたり、あるいは、導入した核酸がコードする生理活性物質を体内で産生させることにより疾患の治療を行うものであるが、多くの場合、核酸の細胞内への導入効率を高める手段としてベクター（導入剤）が用いられている。

【0 0 0 3】

これらベクターの代表例の一つは、ウイルスベクターである。ウイルスが元来有する細胞への感染能力を利用するもので、一例としてレトロウイルスベクター

やアデノウイルスベクターを挙げることができ、応用例として、アデノシンデアミナーゼ欠損症の遺伝子治療を目的としたアデノシンデアミナーゼ遺伝子の導入 (Blaese R. M. et al., Science, Vol. 270, 475 (1995)) や癌の治療を目的としたp53遺伝子の導入 (Swisher S. G. et al., J. Natl. Cancer Inst., Vol. 91, 763 (1999)) を挙げることができる。しかしながら、ウイルスベクターは、細胞への核酸の導入効率は高いものの野生型ウイルス (病原性ウイルス) の出現や高い抗原性による重篤な免疫応答の誘導が知られており、安全性の面で大きな不安材料を抱えている。さらに、ベクターの作製工程が極めて複雑であり一般的に工業化することが難しいという問題点がある。

## 【0004】

もう一つのベクターの代表例は、リボソームベクターである。荷電したリボソームが細胞に付着して取込まれる性質を利用したもので、リボソームの中に核酸が封入されたものや、核酸の周囲にリボソームが付着塊を形成しているものが知られている。リボソームの中に核酸が封入されたものの応用例としては脳腫瘍の治療を目的としたインターフェロン $\beta$ 遺伝子の導入 (M. Mizuno et al., Cancer Res., Vol. 50, 7826 (1990)) を挙げることができ、また、核酸の周囲にリボソームが付着塊を形成させる方法の応用例としては細胞工学実験で多用されている培養細胞への遺伝子導入 (Fellner P. L. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., Vol. 84, 7413 (1987)) を挙げることができる。リボソームベクターは、構成成分の主体が天然のリン脂質である場合には安全性の面ではウイルスベクターよりもはるかに優れているものの、ベクターの作成工程及びベクターと核酸との複合体の作製工程が複雑、細胞への核酸の導入効率が低いという問題点がある。また、リボソームの構成成分が合成脂質である場合には細胞への核酸の導入効率及び操作性は改善されるものの毒性が出現するという問題点がある。さらに、いずれのリボソームも、核酸との複合体形成後の保存性が悪いために製剤化上の課題を抱えている。

## 【0005】

この他のベクターの例としてはペプチドベクターを挙げることができ、その一つとして、ポリリジン及びその修飾体が研究されている。このベクターは、正に荷電したペプチドが負に荷電した核酸と静電的に結合し、かつ、細胞にも付着しやすい性質を利用したものである。しかし、ポリリジンを単独でペプチドベクターとして用いる場合、共有結合したオリゴヌクレオチドは細胞へ導入される (Lemaitre M. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., Vol. 84, 648 (1987)) が、静電的に結合したオリゴヌクレオチドやプラスミドを実質的に細胞へ導入するためにはポリリジンを糖や糖蛋白質あるいはリン脂質などで修飾する必要があることが多数の研究から明らかにされている (Wu, G. Y. et al., J. Biol. Chem., Vol. 262, 4429 (1987)、Zhou, X. et al., Biochim. Biophys. Acta, Vol. 1065, 8 (1991)、Liang, W. W. et al., Biochim. Biophys. Acta, Vol. 1279, 227 (1996))。また、未修飾のポリリジンは動物体内に投与した場合に著しい毒性を示す。

#### 【0006】

ペプチドベクターの他の例としては、ペプチド単独で核酸のベクターとなり得るものが挙げられ、 $\alpha$ -ヘリックス構造を有する両親媒性塩基性ペプチドがその構造上の特徴からペプチド単独で核酸のベクターとして導入効率が高いことが示されている (Niidome T. et al., J. Biol. Chem., Vol. 272, 15307 (1997))。

しかし、このペプチドは、エドモンソン・ホイール・プロット法による $\alpha$ -ヘリックス構造モデルにおいて、疎水面と荷電面（親水面）とからなる典型的な二面構造を示し、核酸を細胞に導入する能力を維持するためには疎水面の割合を大きくする必要があり、その結果、水溶性が悪いという欠点を有している。

この場合水溶性を改善するために疎水面の割合を小さくすると細胞への核酸導入能が減少してしまう。また、該ペプチドの荷電面である親水面はその割合が小さく核酸が静電的に結合するとペプチドの親水性が消失し、ペプチドと核酸との複合体は極めて難溶性となり、結果として実質的に問題となるような凝集体を形

成し易いという欠点をも有している。さらに、血清中で容易に凝集してしまうため、動物体内に投与した場合に著しい毒性を示す。

【0007】

故に、ペプチドベクターは、一般的性状として、核酸と単に混合するだけで複合体が形成されるという優れた操作性を有しているが、特に血液中では容易に凝集塊を形成し易いという欠点があり、さらに、核酸との複合体も溶解性が悪く、毒性も強く、実用上の欠点がある。

また、いずれのベクターであっても核酸を導入する細胞の選択性がなく、核酸の導入が希望される細胞と同様に核酸の導入が希望されない細胞にも核酸が導入されてしまい、副作用の出現に対する危惧が持たれている。

【0008】

一方、ホスファチジルセリンやホスファチジルエタノールアミンは、細胞表層を形成する脂質二重層の構成成分に含まれるアミノリン脂質であり、脂質二重層の外層と内層に含まれる比率が細胞の状態によって変化するリン脂質である。

例えば、血液凝固反応が進展している部位が代表例として示されるように、細胞が何らかの刺激を受けたときに細胞膜の脂質二重層の外層に含まれる割合が増加するリン脂質であり (Alan J. Schroit et al., Biochim. Biophys. Acta, Vol. 1071, 313 (1991))、炎症若しくは免疫担当細胞による細胞の活性化、及び／又は障害若しくはアポトーシス等のいわゆる免疫応答反応が進展している部位、異常な細胞分裂が進展していわゆる細胞が癌化している部位、血液凝固反応若しくは動脈硬化が進展して血管を構成する細胞が障害されている部位、活性酵素による細胞の障害反応が進展している部位あるいは蛋白質分解酵素による細胞の活性化及び／又は障害反応が進展している部位、等における細胞、例えば、損傷を受けたり変性したり活性化された、いわゆる正常でない細胞においても脂質二重層の外層に含まれる割合が増加すると考えられるリン脂質である。また、ホスファチジルセリンは、アレルゲンが細胞表面のIgE抗体に結合してアレルギー反応(脱顆粒反応)が惹起された細胞(例えば肥満細胞や好塩基球)においても、顆粒に含まれる成分として脱顆粒の際に細胞表面に表出するリン脂質であることが知ら

れている (Martin, S. et al., Int. Arch. Allergy and Immunol., Vol. 123, 249 (2000))。

【0009】

なお、最近の知見では、アポトーシス誘導物質（例えば抗癌剤）などを投与された細胞や放射線照射を受けた細胞で p53 などのアポトーシス関連遺伝子が関与したシグナルが伝達された細胞であっても、薬剤耐性をもつ細胞（抗癌剤耐性癌細胞など）は、アポトーシスを生じることなく DNA 修復が行われて生存しており、その際、細胞表層にホスファチジルセリンを表出していることが報告されている (Geske, FJ. et al., Cell Death Differ., Vol. 8, 182 (2001))。

【0010】

ところで、生理活性を有するペプチドやポリペプチドを PEG で修飾することは、生体内でペプチドやポリペプチドの機能を発揮させる上で有用な手段であることがこれまでの多数の研究から明らかにされている。これは、PEG で修飾することにより、ペプチドやポリペプチドの親水性が上昇して生体内蛋白質との相互作用が減弱することに加えて、網内系に認識されにくくなるためにマクロファージ等に捕獲されにくくなる結果体内動態が改善され、生体内での生理活性の維持・持続がもたらされるためと推定されている。具体的に PEG 修飾の有用性を例示すれば、アデノシンデアミナーゼ (ADA) を PEG で修飾した PEG-ADA は ADA 欠損症の治療において臨床的に有効であることが示されている例 (Hershfield M. S. et al, N. Engl. J. Med., 316, 589 (1987)) や、インターフェロン (IFN) を PEG で修飾することにより生体内における抗ウイルス作用が増強される例 (Perry C M et al, Drugs, 61, 2263 (2001)) を挙げることができる。

【0011】

また、生理活性を有するペプチドやポリペプチドのみならず、ドラッグデリバリーを目的として用いられる薬剤のキャリアーを PEG で修飾することも有用であることが明らかにされつつある (丸山一雄, 日本臨床, 80, 632 (19



98) )。例えば、リポソームをPEGで修飾すると、ペプチドやポリペプチドをPEGで修飾した場合と同様に、生体内で保持される時間が延長されるばかりでなく、網内系に認識されにくくなるために抗原性が減弱するという効果が現れることが明らかにされている。

リポソーム以外の例としては、遺伝子の導入に用いられるPEG化ポリリジンが挙げられる (Lee M. et al., Mol. Ther., 4, 339 (2001))。

ポリリジンはそのままでは毒性が極めて強いがPEG修飾を施すと毒性が減弱することが知られている。

#### 【0012】

このように、PEG修飾は有用性のある技術であるが、修飾後のペプチドやポリペプチドの比活性が低下してしまうという課題を抱えている。これは、活性中心もPEG化されてしまうことによるものである。例えば、アルギナーゼをPEG化すると比活性は65%にまで減少してしまうことが示されている (Savoca K. V. et al, Biochim. Biophys. Acta, 578, 47 (1979))。

したがって、比活性を低下させることなくPEG修飾することができれば有用性がさらに高まることが期待される。

#### 【0013】

##### 【発明が解決しようとする課題】

本発明の課題は、安全性が高く、ペプチドと結合する物質との複合体の作製が容易 (優れた操作性) であり、複合体の溶解性に優れた、細胞へのペプチドと結合する物質の導入選択性が優れ、導入効率が高いベクターとなる、PEG化学修飾による比活性が低下しない新規PEG化学修飾ペプチド、及び、その製造方法を提供することである。

また、本発明の課題は、PEG化学修飾ペプチドと、ペプチドと結合する物質との複合体、及び、その製造方法を提供することである。

#### 【0014】

##### 【課題を解決するための手段】

本発明者らは上記課題を解決すべく鋭意研究を重ねた結果、

①ペプチド（後述する本発明に用いるペプチド及び本発明のPEG化学修飾ペプチド）と結合する物質（本明細書において、「ペプチド結合物質」と略記する）と結合し、特定のリン脂質に親和性を有するペプチドは、細胞へのペプチドと結合する物質の導入効率が高く、毒性が低く、溶解性にも優れた、ペプチド結合物質のベクターとなり得ること、

②アミノ酸配列から規定される構造上の特徴を有するペプチドは、特定のリン脂質への集積性が高く、特定の細胞へ、ペプチド結合物質を導入する選択性に優れること、

③また、当該ペプチドをPEGによって化学修飾することにより、細胞への、ペプチド結合物質の導入効率が、より高くなることを見出し、本発明を完成した。

#### 【0015】

すなわち、本発明により、下記（1）～（9）のPEG化学修飾ペプチド、（10）～（19）のPEG化学修飾ペプチドとペプチド結合物質との複合体、（20）～（24）のそれらの製造方法が提供される。

#### 【0016】

（1）本発明の第1態様は、

18アミノ酸からなる配列を含む、ポリエチレングリコール（PEG）化学修飾ペプチドであって、

前記18アミノ酸からなる配列が、エドモンソン・ホイール・プロット法による $\alpha$ -ヘリックス構造モデルにおいて、交互に配置された二つの疎水面と二つの親水面の4つの面から構成され、

前記疎水面の1つが5～7アミノ酸から構成され、かつ疎水性アミノ酸の構成比率が80モル%以上であり、

前記親水面の1つが5～6アミノ酸から構成され、かつ親水性アミノ酸の構成比率が80モル%以上であって、かつアルギニン又はリジンから選ばれるアミノ酸の構成比率が50モル%以上であり、

前記疎水面の別の1つが2～4疎水性アミノ酸から構成され、

前記親水面の別の1つが3～5アミノ酸から構成され、かつ親水性アミノ酸の構成比率が80モル%以上である、PEG化学修飾ペプチド。

【0017】

(2) 全アミノ酸数が20以上であって、両端がN末端及びC末端であり、両端のアミノ酸を除いた任意の連続した18アミノ酸が、前記18アミノ酸からなる配列を示す(1)に記載のPEG化学修飾ペプチド。

【0018】

(3) N末端及びC末端のアミノ酸が親水性アミノ酸である(1)又は(2)に記載のPEG化学修飾ペプチド。

【0019】

(4) 前記18アミノ酸からなる配列が下記のアミノ酸配列の中の任意の連続した18アミノ酸配列である(1)～(3)のいずれかに記載のPEG化学修飾ペプチド。

X2-X3-X4-X5-X6-X7-X8-X9-X10 -X11 -X12 -X13 -X14 -X15 -X16 -X17 -X18 -X19 -X20 -X21 -X22 -X23 -X24 -X25 -X26 -X27 -X28 -X29 -X30 -X31 -X32 -X33 -X34 -X35 -X36

但し、

「X4、X8、X11、X15、及びX19」、「X8、X11、X15、X19、及びX22」、「X11、X15、X19、X22、及びX26」、「X15、X19、X22、X26、及びX29」、並びに「X19、X22、X26、X29、及びX33」において、それぞれ5アミノ酸中、4アミノ酸以上は疎水性アミノ酸であり、

X3、X10、X12、X21、X28、及びX30はそれぞれ疎水性アミノ酸、中性親水性アミノ酸又は塩基性親水性アミノ酸のいずれかであり、

「X2、X5、X9、X13、及びX16」、「X5、X9、X13、X16、及びX20」、「X9、X13、X16、X20、及びX23」、「X13、X16、X20、X23、及びX27」、「X16、X20、X23、X27、及びX31」、並びに「X20、X23、X27、X31、及びX34」において、それぞれ5アミノ酸中、4アミノ酸以上は中性親水性アミノ酸又は塩基性親水性アミノ酸であり、かつそのうち少なくとも3アミノ酸はアルギニン又はリジンであり、

X6、X17、X24、及びX35はそれぞれ疎水性アミノ酸であり、  
X7、X14、X18、X25、X32、及びX36はそれぞれ中性親水性アミノ酸又は塩  
基性親水性アミノ酸である。

【0020】

(5) 前記18アミノ酸からなる配列を含む、PEG化学修飾ペプチドのペプ  
チド部分が、下記のアミノ酸配列からなる(1)～(4)のいずれかに記載のP  
EG化学修飾ペプチド。

X1-X2-X3-X4-X5-X6-X7-X8-X9-X10 -X11 -X12 -X13 -X14 -X15 -X16 -X17 -X18  
-X19 -X20 -X21 -X22 -X23 -X24 -X25 -X26 -X27 -X28 -X29 -X30 -X31 -X32 -  
X33 -X34 -X35 -X36 -X37

但し、

X1及びX37は親水性アミノ酸であり、

「X4、X8、X11、X15、及びX19」、「X8、X11、X15、X19、及びX22」、  
「X11、X15、X19、X22、及びX26」、「X15、X19、X22、X26、及びX29  
」、並びに「X19、X22、X26、X29、及びX33」において、それぞれ5アミノ  
酸中、4アミノ酸以上は疎水性アミノ酸であり、

X3、X10、X12、X21、X28及びX30はそれぞれ疎水性アミノ酸、中性親水性  
アミノ酸又は塩基性親水性アミノ酸のいずれかであり、

「X2、X5、X9、X13、及びX16」、「X5、X9、X13、X16、及びX20」、  
「X9、X13、X16、X20、及びX23」、「X13、X16、X20、X23、及びX27」  
、「X16、X20、X23、X27、及びX31」、並びに「X20、X23、X27、X31、  
及びX34」において、それぞれ5アミノ酸中、4アミノ酸以上は中性親水性アミ  
ノ酸又は塩基性親水性アミノ酸であり、かつ、そのうち少なくとも3アミノ酸は  
アルギニン又はリジンであり、

X6、X17、X24、及びX35はそれぞれ疎水性アミノ酸であり、

X7、X14、X18、X25、X32、及びX36はそれぞれ中性親水性アミノ酸又は塩  
基性親水性アミノ酸である。

なお、X2からX36までのアミノ酸は少なくとも連続して18アミノ酸が保存さ  
れる限りアミノ酸が欠失、付加、挿入又は置換されてもよい。

【 0 0 2 1 】

( 6 ) 前記 X1 ～ X37 が下記のアミノ酸である ( 5 ) に記載の P E G 化学修飾ペプチド。

X1 はトレオニンであり、

X37 はセリンであり、

X2、X5、X9、X20、X23、及び X27 はそれぞれアルギニン又はリジンであり、

X3 及び X21 はそれぞれチロシン、フェニルアラニン、セリン又はアルギニンのいずれかであり、

X4、X17、X22、及び X35 はそれぞれロイシンであり、

X6、X15、X24、及び X33 はそれぞれロイシン又はイソロイシンであり、

X7、X13、X25、及び X31 はそれぞれヒスチジン又はアルギニンであり、

X8 及び X26 はそれぞれプロリンであり、

X10 及び X28 はそれぞれセリン、アルギニン又はロイシンのいずれかであり、

X11 及び X29 はそれぞれトリプトファン又はロイシンであり、

X12 及び X30 はそれぞれバリン、ロイシン又はセリンのいずれかであり、

X14 及び X32 はそれぞれグルタミン、アスパラギン又はアルギニンのいずれかであり、

X16 及び X34 はそれぞれアラニン又はアルギニンであり、

X18 はアルギニン、リジン又はセリンのいずれかであり、

X19 はロイシン又はトレオニンであり、

X36 はアルギニン又はセリンである。

なお、X2 から X36 までのアミノ酸は少なくとも連続して 1 8 アミノ酸が保存される限りアミノ酸が欠失、付加、挿入又は置換されてもよい。

【 0 0 2 2 】

( 7 ) 前記 1 8 アミノ酸からなる配列を含む、P E G 化学修飾ペプチドのペプチド部分が、配列番号 1 ～ 2 4 のいずれかのアミノ酸配列からなる、( 1 ) ～ ( 6 ) のいずれかに記載の P E G 化学修飾ペプチド。

【 0 0 2 3 】

( 8 ) 前記 1 8 アミノ酸からなる配列を含む、P E G 化学修飾ペプチドのペプ

チド部分が、配列番号 1 6 又は 1 9 のアミノ酸配列からなる、(1) ~ (6) のいずれかに記載の P E G 化学修飾ペプチド。

【 0 0 2 4 】

(9) 前記 1 8 アミノ酸からなる配列を含む、P E G 化学修飾ペプチドの P E G 部分の分子量が、約 2 0 0 D a ~ 約 1 0 0 , 0 0 0 D a である (1) ~ (8) のいずれかに記載の P E G 化学修飾ペプチド。

【 0 0 2 5 】

(10) 本発明の第 2 態様は、

以下の 1 8 アミノ酸からなる配列を含む P E G 化学修飾ペプチド、及び、ペプチドと結合する物質を含有する複合体であって、

前記 1 8 アミノ酸からなる配列が、エドモンソン・ホイール・プロット法による  $\alpha$ -ヘリックス構造モデルにおいて、交互に配置された二つの疎水面と二つの親水面の 4 つの面から構成され、

前記疎水面の 1 つが 5 ~ 7 アミノ酸から構成され、かつ疎水性アミノ酸の構成比率が 8 0 モル%以上であり、

前記親水面の 1 つが 5 ~ 6 アミノ酸から構成され、かつ親水性アミノ酸の構成比率が 8 0 モル%以上であって、かつアルギニン又はリジンから選ばれるアミノ酸の構成比率が 5 0 モル%以上であり、

前記疎水面の別の 1 つが 2 ~ 4 疎水性アミノ酸から構成され、

前記親水面の別の 1 つが 3 ~ 5 アミノ酸から構成され、かつ親水性アミノ酸の構成比率が 8 0 モル%以上である、複合体。

【 0 0 2 6 】

(11) 全アミノ酸数が 2 0 以上であって、両端が N 末端及び C 末端であり、両端のアミノ酸を除いた任意の連続した 1 8 アミノ酸が、前記 1 8 アミノ酸からなる配列を示す (10) に記載の複合体。

【 0 0 2 7 】

(12) N 末端及び C 末端のアミノ酸が親水性アミノ酸である (10) 又は (11) に記載の複合体。

【 0 0 2 8 】

(13) 前記18アミノ酸からなる配列が下記のアミノ酸配列の中の任意の連続した18アミノ酸配列である(10)～(12)のいずれかに記載の複合体。

X2-X3-X4-X5-X6-X7-X8-X9-X10 -X11 -X12 -X13 -X14 -X15 -X16 -X17 -X18 -X19 -X20 -X21 -X22 -X23 -X24 -X25 -X26 -X27 -X28 -X29 -X30 -X31 -X32 -X33 -X34 -X35 -X36

但し、

「X4、X8、X11、X15、及びX19」、「X8、X11、X15、X19、及びX22」、「X11、X15、X19、X22、及びX26」、「X15、X19、X22、X26、及びX29」、並びに「X19、X22、X26、X29、及びX33」において、それぞれ5アミノ酸中、4アミノ酸以上は疎水性アミノ酸であり、

X3、X10、X12、X21、X28、及びX30はそれぞれ疎水性アミノ酸、中性親水性アミノ酸又は塩基性親水性アミノ酸のいずれかであり、

「X2、X5、X9、X13、及びX16」、「X5、X9、X13、X16、及びX20」、「X9、X13、X16、X20、及びX23」、「X13、X16、X20、X23、及びX27」、「X16、X20、X23、X27、及びX31」、並びに「X20、X23、X27、X31、及びX34」において、それぞれ5アミノ酸中、4アミノ酸以上は中性親水性アミノ酸又は塩基性親水性アミノ酸であり、かつそのうち少なくとも3アミノ酸はアルギニン又はリジンであり、

X6、X17、X24、及びX35はそれぞれ疎水性アミノ酸であり、

X7、X14、X18、X25、X32、及びX36はそれぞれ中性親水性アミノ酸又は塩基性親水性アミノ酸である。

【0029】

(14) 前記18アミノ酸からなる配列を含む、PEG化学修飾ペプチドのペプチド部分が、下記のアミノ酸配列からなる(10)～(13)のいずれかに記載の複合体。

X1-X2-X3-X4-X5-X6-X7-X8-X9-X10 -X11 -X12 -X13 -X14 -X15 -X16 -X17 -X18 -X19 -X20 -X21 -X22 -X23 -X24 -X25 -X26 -X27 -X28 -X29 -X30 -X31 -X32 -X33 -X34 -X35 -X36 -X37

但し、

X1及びX37 は親水性アミノ酸であり、

「X4、X8、X11、X15、及びX19」、「X8、X11、X15、X19、及びX22」、「X11、X15、X19、X22、及びX26」、「X15、X19、X22、X26、及びX29」、並びに「X19、X22、X26、X29、及びX33」において、それぞれ5アミノ酸中、4アミノ酸以上は疎水性アミノ酸であり、

X3、X10、X12、X21、X28 及びX30 はそれぞれ疎水性アミノ酸、中性親水性アミノ酸又は塩基性親水性アミノ酸のいずれかであり、

「X2、X5、X9、X13、及びX16」、「X5、X9、X13、X16、及びX20」、「X9、X13、X16、X20、及びX23」、「X13、X16、X20、X23、及びX27」、「X16、X20、X23、X27、及びX31」、並びに「X20、X23、X27、X31、及びX34」において、それぞれ5アミノ酸中、4アミノ酸以上は中性親水性アミノ酸又は塩基性親水性アミノ酸であり、かつ、そのうち少なくとも3アミノ酸はアルギニン又はリジンであり、

X6、X17、X24、及びX35 はそれぞれ疎水性アミノ酸であり、

X7、X14、X18、X25、X32、及びX36 はそれぞれ中性親水性アミノ酸又は塩基性親水性アミノ酸である。

なお、X2からX36 までのアミノ酸は少なくとも連続して18アミノ酸が保存される限りアミノ酸が欠失、付加、挿入又は置換されてもよい。

【0030】

(15) 前記X1～X37 が下記のアミノ酸である(14)に記載の複合体。

X1はトレオニンであり、

X37 はセリンであり、

X2、X5、X9、X20、X23、及びX27 はそれぞれアルギニン又はリジンであり、

X3及びX21 はそれぞれチロシン、フェニルアラニン、セリン又はアルギニンのいずれかであり、

X4、X17、X22、及びX35 はそれぞれロイシンであり、

X6、X15、X24、及びX33 はそれぞれロイシン又はイソロイシンであり、

X7、X13、X25、及びX31 はそれぞれヒスチジン又はアルギニンであり、

X8及びX26 はそれぞれプロリンであり、



X10 及びX28 はそれぞれセリン、アルギニン又はロイシンのいずれかであり、  
 X11 及びX29 はそれぞれトリプトファン又はロイシンであり、  
 X12 及びX30 はそれぞれバリン、ロイシン又はセリンのいずれかであり、  
 X14 及びX32 はそれぞれグルタミン、アスパラギン又はアルギニンのいずれかであり、

X16 及びX34 はそれぞれアラニン又はアルギニンであり、  
 X18 はアルギニン、リジン又はセリンのいずれかであり、  
 X19 はロイシン又はトレオニンであり、  
 X36 はアルギニン又はセリンである。

なお、X2からX36 までのアミノ酸は少なくとも連続して18アミノ酸が保存される限りアミノ酸が欠失、付加、挿入又は置換されてもよい。

【 0 0 3 1 】

(16) 前記18アミノ酸からなる配列を含む、PEG化学修飾ペプチドのペプチド部分が、配列番号1～24のいずれかのアミノ酸配列を含む、(10)～(15)のいずれかに記載の複合体。

【 0 0 3 2 】

(17) 前記18アミノ酸からなる配列を含む、PEG化学修飾ペプチドのペプチド部分が、配列番号16又は19のアミノ酸配列を含む(10)～(15)のいずれかに記載の複合体。

【 0 0 3 3 】

(18) ペプチドと結合する物質が核酸である、(10)～(17)のいずれかに記載の複合体。

【 0 0 3 4 】

(19) 前記18アミノ酸からなる配列を含む、PEG化学修飾ペプチドのPEG部分の分子量が、約200Da～約100,000Daである(10)～(18)のいずれかに記載の複合体。

【 0 0 3 5 】

(20) 18アミノ酸からなる配列を含むペプチドと活性化ポリエチレングリコールとを反応させる、(1)～(9)のいずれかに記載のPEG化学修飾ペプ

チドの製造方法。

【 0 0 3 6 】

( 2 1 ) ( 2 0 ) の方法により製造される、ポリエチレングリコール ( P E G ) により化学修飾されたペプチド。

【 0 0 3 7 】

( 2 2 ) a ) 1 8 アミノ酸からなる配列を含むペプチドと、活性化ポリエチレングリコール ( P E G ) とを反応させる工程、

b ) 前記 a ) により得られる P E G 化学修飾ペプチドと、ペプチドと結合する物質とを反応させる工程、

よりなる、( 1 0 ) ~ ( 1 9 ) のいずれかに記載の複合体の製造方法。

【 0 0 3 8 】

( 2 3 ) a ) 1 8 アミノ酸からなる配列を含むペプチドと、ペプチドと結合する物質とを反応させる工程、

b ) 前記ペプチドと前記ペプチドと結合する物質との反応物を、活性化ポリエチレングリコール ( P E G ) と反応させる工程、

よりなる、( 1 0 ) ~ ( 1 9 ) のいずれかに記載の複合体の製造方法。

【 0 0 3 9 】

( 2 4 ) ( 2 2 ) 又は ( 2 3 ) の方法により製造される、ポリエチレングリコール ( P E G ) により化学修飾されている P E G 化学修飾ペプチドとペプチドと結合する物質との複合体。

【 0 0 4 0 】

【発明の実施の形態】

以下に、より詳細に本発明を説明する。

本発明の P E G 化学修飾ペプチド ( 本発明の第一の態様 ) は、エドモンソン・ホイール・プロット法 ( Edmundson, A. B. et al., Biophys. J., Vol. 7, 121 (1967) ) による  $\alpha$ -ヘリックス構造モデルにおいて、交互に配置された二つの疎水面 ( 側面 A、側面 C ) と二つの親水面 ( 側面 B、側面 D ) の 4 つの面から構成され、二つの親水面 ( 側面 B、側面 D ) のうち少なくとも 1 つ ( 側面 B ) が正荷電面である 1 8 アミノ酸からなる配列

を含む、PEGにより化学修飾されたペプチド（以下、「PEG化学修飾ペプチド」と略記する）である。

#### 【0041】

本発明のPEG化学修飾ペプチドは、後に詳述する、上記18アミノ酸からなる配列を含むペプチド（以下、「本発明に用いるペプチド」と略記する）を、例えば、活性化PEGで化学修飾して得られる。

PEGにより化学修飾する方法は、特に限定されず、例えば、活性化PEGを用いる方法、PEGと活性化剤等を用いる方法等が挙げられる。

活性化PEGにより化学修飾する方法に用いられるPEGは、活性化PEGであれば特に限定されず、直鎖構造又は分岐鎖構造のものであってもよく、例えば、mPEG-SPA5000 (succinimidyl ester of methoxy poly(ethylene glycol) propionic acid, Average M. W. 5000, Shearwater 社製)、や同社製のmPEG-SPA、mPEG-SBA、mPEG-SS、mPEG-SCM、mPEG-BTC、mPEG-epoxide、mPEG-CDI、mPEG-NPC、mPEG-aldehyde、mPEG-NCO、mPEG-maleimide、mPEG-OPSS等の活性化PEG等が挙げられる。またPEGは、公知の方法で合成したものをを用いることもできる。

#### 【0042】

PEGの重量平均分子量は、約200Da～約100,000Daであればよく、好ましくは約1,000Da～約50,000Da、さらに好ましくは約2,000Da～約20,000Daである。

この範囲であれば、活性化PEGはペプチドと反応しても、PEG化修飾ペプチドは元のペプチドの活性を維持し、かつ溶解性を更に上げる、抗原性を減弱する、毒性を減弱するなど、より好ましい性質を付与することが可能である。

#### 【0043】

PEGと活性化剤等により化学修飾する方法に用いられるPEG、活性化剤は通常用いられるものであれば、任意に選択して用いることができる。

#### 【0044】

本発明の P E G 化学修飾ペプチドにおける P E G の修飾（結合）位置は、特に限定されず、何れであってもよいが、本発明に用いるペプチドが核酸等のペプチド結合物質及びホスファチジルセリン等と結合する位置以外の位置であるのが好ましく、その N 末端、C 末端又は側鎖の位置がより好ましい。

ペプチドの所望する位置に P E G を導入する方法としては、公知の方法を用いることができる。

また、本発明に用いるペプチドに対する、P E G の修飾量（結合量）も特に限定されない。

#### 【 0 0 4 5 】

本発明に用いるペプチドを活性化 P E G で修飾することにより、本発明に用いるペプチドが本来有する特徴、性質等（詳細は後述する）をより優れたものとすることができる。

具体的には、本発明に用いるペプチドに対して、例えば、標的細胞への遺伝子の取り込み率の向上、薬理活性の向上、毒性の低減等の優れた効果を有する。

#### 【 0 0 4 6 】

次に、本発明に用いるペプチドである、18 アミノ酸からなる配列を含むペプチドの必須構造である「18 アミノ酸からなる配列」について図を用いて説明する。

エドモンソン・ホイール・プロット法は  $\alpha$ -ヘリックスの中心線を基点としたアミノ酸の相対位置を示すモデルであって、18 アミノ酸で一巡し、19 番目のアミノ酸が1 番目のアミノ酸と同位置に来るように表記する。

この表記法によって描かれるモデルでは、通常、基点となる第一番目のアミノ酸が時計の12 時の位置に来るよう記載されるが、アミノ酸配列が同一である限り表記上の起点が異なっても図上の各アミノ酸の相対的位置は変わらず、例えば図1 において、(A)、(B)、(C) はいずれも本質的に同一である。

#### 【 0 0 4 7 】

以下、本明細書において、「面」とは、モデルで互いに連続して隣接するアミノ酸から構成される領域を言う。面は、構成アミノ酸数が1 以上であればよく、好ましくは、構成アミノ酸数が2 以上である。

「互いに連続して隣接する」とは、例えば図1において、1番目と12番目のアミノ酸の位置関係や、15番目、8番目、1番目及び12番目の4アミノ酸の位置関係を指す。一方、1番目と10番目のアミノ酸の位置関係は互いに連続していない。また、1番目と5番目のアミノ酸の位置関係は「互いに連続して隣接する」位置関係ではないが、12番目のアミノ酸を含むことにより同一の面を形成してもよい。

「疎水面」とは、実質的に疎水性アミノ酸を多く含む面である。疎水性アミノ酸は、実質的に疎水性であれば限定されない。天然の疎水性アミノ酸、それと性質がほぼ同等の修飾されたアミノ酸や合成アミノ酸なども含まれる。

#### 【0048】

本発明に用いるペプチドは、疎水面に疎水性アミノ酸を80モル%以上含むことが好ましい。また、酸性親水性アミノ酸（アスパラギン酸、グルタミン酸）を含まないことがより好ましい。これはペプチドの正荷電部分と核酸の陰荷電部分とが静電的に結合するので、酸性親水性アミノ酸が該結合に対して阻害的に作用するからである。

また、疎水性アミノ酸はロイシン、イソロイシン、バリン、トリプトファン、プロリン、チロシン、アラニン、フェニルアラニン、メチオニン、システイン、グリシンから選ばれるアミノ酸であることが好ましい。また、疎水面のうちの一つ（側面A）は5～7アミノ酸から構成されていることが好ましい。疎水面の別の一つ（側面C）は2～4アミノ酸から構成されていることが好ましい。特に側面Cはすべて疎水性アミノ酸であることが好ましい。

疎水面（側面A、側面C）の一例を図2に示す。

#### 【0049】

「親水面」とは、実質的に親水性アミノ酸を多く含む面である。親水性アミノ酸は、実質的に親水性であれば限定されない。天然の親水性アミノ酸、それと性質がほぼ同等の修飾されたアミノ酸や合成アミノ酸なども含まれる。

「正荷電面」とは、「親水面」であって、かつ、実質的に正に荷電した親水性アミノ酸を多く含む面である。実質的に正に荷電した天然の親水性アミノ酸、それと性質がほぼ同等の修飾されたアミノ酸や合成アミノ酸なども含まれる。

本発明に用いるペプチドは、親水面に親水性アミノ酸を80モル%以上含むことが好ましい。また、親水性アミノ酸はアスパラギン、グルタミン、トレオニン、セリン、アルギニン、ヒスチジン、リジン、アスパラギン酸、グルタミン酸から選ばれるアミノ酸であることが好ましい。さらに、酸性親水性アミノ酸以外の親水性アミノ酸、すなわちアスパラギン、グルタミン、トレオニン、セリン、アルギニン、ヒスチジン又はリジンから選ばれるアミノ酸であることが好ましい。これはペプチドの正荷電部分と核酸の陰荷電部分とが静電的に結合するので、酸性親水性アミノ酸が該結合に対して阻害的に作用するからである。

## 【0050】

親水面のうちの一つ（側面B）は正荷電面であり、5～6アミノ酸から構成されていることが好ましい。さらにリジン又はアルギニンから選ばれるアミノ酸の構成比率が50モル%以上であることが好ましい。

親水面の別の一つ（側面D）は3～5アミノ酸から構成されていることが好ましい。

親水面（側面D）及び正荷電面（側面B）の一例を図2に示す。

なお、モル%とは、疎水面を構成するアミノ酸の数に対する該面に含まれる疎水性アミノ酸の数の比、親水面を構成するアミノ酸の数に対する該面に含まれる親水性アミノ酸の数の比又は正荷電面を構成するアミノ酸の数に対する該面に含まれるリジン又はアルギニンから選ばれるアミノ酸の数の比である。

## 【0051】

本発明に用いるペプチドの特徴である交互に配置された二つの疎水面と二つの親水面（ただし、少なくとも一面は正荷電面）から構成される四面構造は、モデル上に図示された18アミノ酸を前述の定義にしたがって面に分割した場合に、二つの疎水面（側面A、側面C）と二つの親水面（側面B、側面D：但し、少なくとも側面Bは正荷電面）とが互いに交互に隣接して4つの面を構成する構造である。

なお、疎水面と疎水面とが直接隣接する場合は2つの疎水面ではなく全体として1つの疎水面であり、親水面と親水面とが直接隣接する場合は2つの親水面ではなく全体として1つの親水面であり、正荷電面と正荷電面とが直接隣接する場

合は2つの正荷電面ではなく全体として1つの正荷電面である。

すなわち、該四面構造において、疎水面と疎水面、親水面と親水面、及び正荷電面と正荷電面とは互いに隣接しない。

#### 【0052】

「交互に隣接して4つの面を構成する構造」は、エドモンソン・ホイール・プロット法による $\alpha$ -ヘリックス構造モデルにおいて、向かって右廻りに、側面A→側面B→側面C→側面D（→側面A）又は、向かって右廻りに、側面A→側面D→側面C→側面B（→側面A）となるよう配置され、機能が保持される限りいずれの形態であっても良い。好ましくは、向かって右廻りに、側面A→側面B→側面C→側面D（→側面A）になるよう配置される配列である。なお、該四面構造は、各々の面がその性質を維持する限り、分割方法、すなわち、18アミノ酸の個々のアミノ酸の4つの面への割り振り方は特に制限されない。

アミノ酸配列に基づき、側面Aは5～7アミノ酸、側面Bは5～6アミノ酸、側面Cは2～4アミノ酸、側面Dは3～5アミノ酸となるよう割り振られることが好ましい。

#### 【0053】

一例として、アミノ酸配列の各面への割り振りが異なる3つの配列を図3及び図4にA～C（C1及びC2）として示す。なお、C1とC2のアミノ酸配列は全く同一であり、アミノ酸配列の各面への割り振りを变化させた場合にどちらでも前述の定義に含まれる例である。A～C（C1及びC2）におけるアミノ酸の割り振りは下記のとおりである。

	疎水面 (側面A)	親水面 (側面B)	疎水面 (側面C)	親水面 (側面D)
A	5	6	2	5
B	6	5	4	3
C 1	6	5	3	4
C 2	7	5	3	3

#### 【0054】

本発明に用いるペプチドは、上記した特徴である四面構造を示す18アミノ酸

からなる配列を含むことにより、ペプチド自身の水溶性が優れている、及び、ペプチド結合物質と複合体を形成するとき、その複合体が実質的に問題となる凝集体を形成しないという特徴を有する。

## 【0055】

本発明に用いるペプチドは、「従来技術」に記載した $\alpha$ -ヘリックス構造を有するペプチドベクターと異なり、 $\alpha$ -ヘリックス構造をとる際に疎水面が複数形成されるため、疎水面の割合を小さくして水溶性を向上させても、ペプチド結合物質を細胞に導入する能力が高い。一方、同時に親水面が複数形成されるため、親水面の割合が二面構造の場合に比べて大きくなり、少なくとも一つ存在する正荷電面にペプチド結合物質が静電的に結合してもペプチドの親水性は完全には消失しないので、ペプチドとペプチド結合物質との複合体は水溶性を維持し、結果として実質的に問題となるような凝集塊を形成することがない。したがって、ペプチドが高いペプチド結合物質導入能と優れた水溶性を併せ持つためには、 $\alpha$ -ヘリックス構造をとる際に疎水面と親水面（少なくとも一面は正荷電面）とが各々複数形成されることが必要である。

そして、上記性質を有する本発明に用いるペプチドを含む、本発明のPEG化学修飾ペプチドは、上記性質、特性に対して、より優れる。

## 【0056】

なお、疎水面と親水面が複数形成され、かつペプチドベクターとしての機能が維持される限り、面の数に制限はない。好ましくは各々二面である。特に、複数の親水面のうち少なくとも一面が中性親水性アミノ酸に富んだ面（実質的に荷電状態にない）であれば、該面がペプチド結合物質と結合することはなく、その結果、該面の水溶性がほぼ完全に維持されるので、より好ましい。

本発明に用いるペプチドは、その機能が保持される限り、アミノ酸配列の長さは何ら制限されない。好ましくは全アミノ酸残基数が20以上、より好ましくは25以上、更に好ましくは30以上のペプチドである。また、好ましくは全アミノ酸数が100以下、より好ましくは50以下、さらに好ましくは40以下のペプチドである。

本発明に用いるペプチドは、任意のアミノ酸を起点とした連続する18アミノ



酸配列を一つ以上含む。好ましくは、任意のアミノ酸を起点とした連続する18アミノ酸配列が各々独立して二つ以上存在する、及び／又は二つ以上存在する配列が部分的に重複して存在する。より好ましくは、両端のアミノ酸を除く任意の連続した18アミノ酸配列が、本発明の四面構造を示す18アミノ酸配列を示すペプチドである。すなわち両端のアミノ酸を除いた任意の連続した18アミノ酸配列が重複してすべて本発明の四面構造を示すペプチドである。

## 【0057】

ここで言う「18アミノ酸配列」は、エドモンソン・ホイール・プロット法による $\alpha$ -ヘリックスモデルにおいて側面A、側面B、側面C、側面Dが右回りに配置（本明細書において、「本発明の四面構造」と略記する）されている18アミノ酸からなる配列（本明細書において、「本発明の四面構造を示す18アミノ酸配列」と略記する）である。

「両端のアミノ酸を除く任意の連続した18アミノ酸配列」とは、例えば、N（但し、Nは20以上）個のアミノ酸からなるペプチドにおいて2番目～19番目、3番目～20番目、4番目～21番目、以下同様に（N-18）番目～（N-1）番目までの任意の配列である。「重複してすべて本発明の四面構造を示す」とは、前述の2番目～19番目、3番目～20番目、4番目～21番目、以下同様に（N-18）番目～（N-1）番目までのすべての配列が本発明の四面構造を示すことである。一例として配列番号16のペプチドの2番目～19番目、3番目～20番目、4番目～21番目、19～36番目の18アミノ酸からなる配列を、図5及び図6にA～Dとしてエドモンソン・ホイール・プロット法による $\alpha$ -ヘリックスモデルで示した。これらの配列は、いずれも本発明の四面構造を示す。

## 【0058】

本発明に用いるペプチドは、該ペプチドと、ペプチド結合物質との複合体の溶解性を更に改善するという観点から、少なくとも一端が、好ましくは両端が親水性アミノ酸であることが好ましい。

ここでいうペプチド結合物質には、核酸、酸性蛋白質等の酸性高分子、負に荷電した側鎖を有する低分子化合物等で生理活性を有する物質等が含まれる（詳し

くは後述する)。

親水性アミノ酸は親水性である限り限定されない。好ましくは酸性親水性アミノ酸以外の親水性アミノ酸、より好ましくは中性親水性アミノ酸、さらに好ましくはトレオニン又はセリンである。

# 【 0 0 5 9 】

本発明に用いるペプチドに含まれる「本発明の四面構造を示す 1 8 アミノ酸配列」の好適例として、下記のアミノ酸配列の中の任意の連続した 1 8 アミノ酸からなる配列が挙げられる。

X2-X3-X4-X5-X6-X7-X8-X9-X10 -X11 -X12 -X13 -X14 -X15 -X16 -X17 -X18 -X19 -X20 -X21 -X22 -X23 -X24 -X25 -X26 -X27 -X28 -X29 -X30 -X31 -X32 -X33 -X34 -X35 -X36

但し、

「X4、X8、X11、X15、及びX19」、「X8、X11、X15、X19、及びX22」、「X11、X15、X19、X22、及びX26」、「X15、X19、X22、X26、及びX29」並びに「X19、X22、X26、X29、及びX33」において、それぞれ 5 アミノ酸中、4 アミノ酸以上が疎水性アミノ酸であり、

X3、X10、X12、X21、X28、及びX30 は、それぞれ疎水性アミノ酸、中性親水性アミノ酸又は塩基性親水性アミノ酸のいずれかであり、

「X2、X5、X9、X13、及びX16」、「X5、X9、X13、X16、及びX20」、「X9、X13、X16、X20、及びX23」、「X13、X16、X20、X23、及びX27」、「X16、X20、X23、X27、及びX31」、並びに「X20、X23、X27、X31、及びX34」において、それぞれ 5 アミノ酸中、4 アミノ酸以上が中性親水性アミノ酸又は塩基性親水性アミノ酸であり、かつ、そのうち少なくとも 3 アミノ酸はアルギニン又はリジンであり、

X6、X17、X24、及びX35 はそれぞれ疎水性アミノ酸であり、

X7、X14、X18、X25、X32、及びX36 はそれぞれ中性親水性アミノ酸又は塩基性親水性アミノ酸である。

# 【 0 0 6 0 】

好ましくは、

X8及びX26 はそれぞれプロリンであり、  
 X4、X17、X22、及びX35 はそれぞれロイシンであり、  
 X6、X11、X15、X24、X29、及びX33 はそれぞれ疎水性アミノ酸であり、  
 X12、X19、及びX30 はそれぞれ疎水性アミノ酸又は中性親水性アミノ酸であり、

X2、X5、X9、X20、X23、及びX27 はそれぞれ塩基性親水性アミノ酸であり、  
 X13 及びX31 はそれぞれ塩基性親水性アミノ酸又は中性親水性アミノ酸であり、

X16 及びX34 はそれぞれ疎水性アミノ酸又は塩基性親水性アミノ酸であり、  
 「X2、X5、X9、X13、及びX16」、「X5、X9、X13、X16、及びX20」、  
 「X9、X13、X16、X20、及びX23」、「X13、X16、X20、X23、及びX27」、  
 「X16、X20、X23、X27、及びX31」、並びに「X20、X23、X27、X31、  
 及びX34」において、それぞれ5アミノ酸中、少なくとも3アミノ酸はアルギニン  
 又はリジンであり、

X3、X10、X21、及びX28 はそれぞれ疎水性アミノ酸、中性親水性アミノ酸又は  
 塩基性親水性アミノ酸のいずれかであり、

X7、X14、X18、X25、X32、及びX36 はそれぞれ中性親水性アミノ酸又は塩  
 基性親水性アミノ酸である。

【0061】

より好ましくは

X2、X5、X9、X20、X23、及びX27 はそれぞれアルギニン又はリジンであり、  
 X3及びX21 はそれぞれチロシン、フェニルアラニン、セリン又はアルギニンの  
 いずれかであり、

X4、X17、X22、及びX35 はそれぞれロイシンであり、  
 X6、X15、X24、及びX33 はそれぞれロイシン又はイソロイシンであり、  
 X7、X13、X25、及びX31 はそれぞれヒスチジン又はアルギニンであり、  
 X8及びX26 はそれぞれプロリンであり、  
 X10 及びX28 はそれぞれセリン、アルギニン又はロイシンのいずれかであり、  
 X11 及びX29 はそれぞれトリプトファン又はロイシンであり、

X12 及びX30 はそれぞれバリン、ロイシン又はセリンのいずれかであり、  
X14 及びX32 はそれぞれグルタミン、アスパラギン又はアルギニンのいずれかであり、

X16 及びX34 はそれぞれアラニン又はアルギニンであり、

X18 はアルギニン、リジン又はセリンのいずれかであり、

X19 はロイシン又はトレオニンであり、

X36 はアルギニン又はセリンである。

なお、X2からX36 までのアミノ酸は少なくとも連続して18アミノ酸が保存される限りアミノ酸が欠失、付加、挿入又は置換されてもよい。

なお、前記において、疎水性アミノ酸はロイシン、イソロイシン、バリン、トリプトファン、プロリン、チロシン、アラニン、システイン、フェニルアラニン、メチオニン又はグリシンのいずれかから選ばれるアミノ酸であり、塩基性親水性アミノ酸はアルギニン、ヒスチジン又はリジンのいずれかから選ばれるアミノ酸であり、中性親水性アミノ酸はアスパラギン、グルタミン、トレオニン又はセリンのいずれかから選ばれるアミノ酸である。

【 0 0 6 2 】

また、本発明に用いるペプチドの好適例として、下記のアミノ酸配列からなるペプチドが挙げられる。

X1-X2-X3-X4-X5-X6-X7-X8-X9-X10 -X11 -X12 -X13 -X14 -X15 -X16 -X17 -X18  
-X19 -X20 -X21 -X22 -X23 -X24 -X25 -X26 -X27 -X28 -X29 -X30 -X31 -X32 -  
X33 -X34 -X35 -X36 -X37

但し、

X1及びX37 は親水性アミノ酸であり、

「X4、X8、X11、X15、及びX19」、「X8、X11、X15、X19、及びX22」、「X11、X15、X19、X22、及びX26」、「X15、X19、X22、X26、及びX29」、並びに「X19、X22、X26、X29、及びX33」において、それぞれ5アミノ酸中、4アミノ酸以上が疎水性アミノ酸であり、

X3、X10、X12、X21、X28、及びX30 はそれぞれ疎水性アミノ酸、中性親水性アミノ酸又は塩基性親水性アミノ酸のいずれかであり、

「X2、X5、X9、X13、及びX16」、「X5、X9、X13、X16、及びX20」、  
「X9、X13、X16、X20、及びX23」、「X13、X16、X20、X23、及びX27」、  
「X16、X20、X23、X27、及びX31」、並びに「X20、X23、X27、X31、  
及びX34」において、それぞれ5アミノ酸中、4アミノ酸以上が中性親水性アミ  
ノ酸又は塩基性親水性アミノ酸であり、かつ、そのうち少なくとも3アミノ酸は  
アルギニン又はリジンであり、

X6、X17、X24、及びX35 はそれぞれ疎水性アミノ酸であり、

X7、X14、X18、X25、X32、及びX36 はそれぞれ中性親水性アミノ酸又は塩  
基性親水性アミノ酸である。

なお、上記アミノ酸配列において、X2からX36 までのアミノ酸は少なくとも連  
続して18アミノ酸が保存される限りアミノ酸が欠失、付加、挿入又は置換され  
てもよい。

【0063】

好ましくは

X1及びX37 はそれぞれトレオニン又はセリンであり、

X8及びX26 はそれぞれプロリンであり、

X4、X17、X22、及びX35 はそれぞれロイシンであり、

X6、X11、X15、X24、X29、及びX33 はそれぞれ疎水性アミノ酸であり、

X12、X19、及びX30 はそれぞれ疎水性アミノ酸又は中性親水性アミノ酸であ  
り、

X2、X5、X9、X20、X23、及びX27 はそれぞれ塩基性親水性アミノ酸であり、

X13 及びX31 はそれぞれ塩基性親水性アミノ酸又は中性親水性アミノ酸であり

X16 及びX34 はそれぞれ疎水性アミノ酸又は塩基性親水性アミノ酸であり、

「X2、X5、X9、X13、及びX16」、「X5、X9、X13、X16、及びX20」、

「X9、X13、X16、X20、及びX23」、「X13、X16、X20、X23、及びX27」

、「X16、X20、X23、X27、及びX31」、並びに「X20、X23、X27、X31、

及びX34」において、それぞれ5アミノ酸中、少なくとも3アミノ酸はアルギニ  
ン又はリジンであり、

X3、X10、X21、及びX28はそれぞれ疎水性アミノ酸、中性親水性アミノ酸又は塩基性親水性アミノ酸のいずれかであり、

X7、X14、X18、X25、X32、及びX36はそれぞれ中性親水性アミノ酸又は塩基性親水性アミノ酸である。

なお、X2からX36までのアミノ酸は少なくとも連続して18アミノ酸が保存される限りアミノ酸が欠失、付加、挿入又は置換されてもよい。

【0064】

より好ましくは、

X1はトレオニンであり、

X37はセリンであり、

X2、X5、X9、X20、X23、及びX27はそれぞれアルギニン又はリジンであり、

X3及びX21はそれぞれチロシン、フェニルアラニン、セリン又はアルギニンのいずれかであり、

X4、X17、X22、及びX35はそれぞれロイシンであり、

X6、X15、X24、及びX33はそれぞれロイシン又はイソロイシンであり、

X7、X13、X25、及びX31はそれぞれヒスチジン又はアルギニンであり、

X8及びX26はそれぞれプロリンであり、

X10及びX28はそれぞれセリン、アルギニン又はロイシンのいずれかであり、

X11及びX29はそれぞれトリプトファン又はロイシンであり、

X12及びX30はそれぞれバリン、ロイシン又はセリンのいずれかであり、

X14及びX32はそれぞれグルタミン、アスパラギン又はアルギニンのいずれかであり、

X16及びX34はそれぞれアラニン又はアルギニンであり、

X18はアルギニン、リジン又はセリンのいずれかであり、

X19はロイシン又はトレオニンであり、

X36はアルギニン又はセリンである。

なお、上記アミノ酸配列中、X2からX36までのアミノ酸は少なくとも連続して18アミノ酸が保存される限りアミノ酸が欠失、付加、挿入又は置換されてもよい。

## 【0065】

なお、前記において、疎水性アミノ酸、塩基性親水性アミノ酸、中性親水性アミノ酸は、前述のアミノ酸配列X2～X36で説明したのと同じである。

ただし、前述のアミノ酸配列は本発明に用いるペプチドの一例であり、本発明に用いるペプチドは、「本発明の四面構造を示す18アミノ酸配列」を含み、かつその機能を保持し、PEG化学修飾ペプチドの機能等を保持する限り、必要に応じて前述のアミノ酸配列に欠失、付加、挿入又は置換などを施すことが可能である。

また、PEG化学修飾ペプチドの機能等を保持する限り、必要に応じて、アミノ酸以外の分子による修飾を施すことも可能である。例えば、生体内における安定性をより上昇させるための糖鎖や脂質若しくは高分子化合物による修飾、及び／又は、抗原提示細胞による該ペプチドの認識をより低く抑えるための糖鎖や脂質若しくは高分子化合物による修飾を施してもよい。例えば、マンノース、コレステロールによる修飾が挙げられる。これらのペプチドも本発明に用いるペプチドに含まれる。

## 【0066】

本発明に用いるペプチドの好ましい態様は酸性親水性アミノ酸を含まないが、この性質は特に修飾を施す場合有用である。すなわち、酸性アミノ酸が含まれずC末端にのみカルボキシル基が存在するよう設計することが可能なので、カルボキシル基に依存した反応を利用して修飾を施す場合、部位特異的なC末端の修飾が可能となり有利である。

また、システイン残基のチオール基を利用した部位特異的な修飾を実施する場合、アミノ酸配列中にシステインが一つだけ含まれるように、好ましくは本発明に用いるペプチドのN末端若しくはC末端に付加すれば、例えば本発明のポリエチレングリコール修飾等する場合に選択的な修飾が可能となり有利である。

## 【0067】

ところで、アミノ酸は側鎖分子の種類、性質によって分類されるが、ペプチドの高次構造を考察する上で重要な指標となる分類は、側鎖分子の極性による分類である。具体的には、以下のように分類される。

(1) 疎水性アミノ酸…グリシン、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、メチオニン、フェニルアラニン、チロシン、システイン、トリプトファン、プロリン

(2) 酸性親水性アミノ酸…アスパラギン酸、グルタミン酸

(3) 中性親水性アミノ酸…セリン、トレオニン、グルタミン、アスパラギン

(4) 塩基性親水性アミノ酸…アルギニン、リジン、ヒスチジン

【0068】

したがって、本発明に用いるペプチドにおいては、上記同じ分類に属するアミノ酸であれば、「本発明の四面構造を示す18アミノ酸配列」という要件を満たしつつ、相互にアミノ酸置換が可能である。例えば、イソロイシンとロイシン、バリンとロイシン、チロシンとフェニルアラニン、トリプトファンとロイシン、アスパラギンとグルタミン、セリンとトレオニン、アルギニンとリジン、ヒスチジンとリジンとは互いに置換が可能である。

なお、ヒスチジンは塩基性親水性アミノ酸に分類されるが、特定の条件下、例えば生理的条件下では荷電状態が小さく、したがって、中性親水性アミノ酸に近い性質をも併せ持っているので、ヒスチジンは塩基性親水性アミノ酸のみならず、中性親水性アミノ酸との置換も可能である。

【0069】

一方、異なる分類に属するアミノ酸であっても、「本発明の四面構造を示す18アミノ酸配列」という要件を満足する限り相互置換することが可能である。

一例を挙げれば下記の通りである。

(1) 疎水性アミノ酸（中性）と中性親水性アミノ酸との置換（中性の任意のアミノ酸との置換と同義）

例：ロイシンとトレオニン、ロイシンとセリン、バリンとセリン、チロシンとセリン

(2) 疎水性アミノ酸（中性）と塩基性親水性アミノ酸との置換（疎水／親水、中性／塩基性という互いに相反する置換であり、酸性親水性アミノ酸以外の任意のアミノ酸との置換と同義）

例：アラニンとアルギニン、チロシンとアルギニン



(3) 中性親水性アミノ酸と塩基性親水性アミノ酸との置換（酸性親水性アミノ酸以外の任意の親水性アミノ酸との置換と同義）

例：セリンとアルギニン、グルタミンとアルギニン

【0070】

さらに、「本発明の四面構造を示す18アミノ酸配列」という要件を満足する限り、前述のアミノ酸置換を組み合わせて実施することも可能である。すなわち、同属内でのアミノ酸置換を組み合わせた一例として、イソロイシンからロイシンへの置換とバリンからロイシンへの置換とを同時に実施する場合、互いに属が異なるアミノ酸置換を組み合わせた一例として、チロシンからセリンへの置換とセリンからロイシンへの置換とを同時に実施する場合、あるいは、同属内でのアミノ酸置換と属が異なるアミノ酸置換とを組み合わせた一例として、イソロイシンからロイシンへの置換とロイシンからトレオニンへの置換とを同時に実施する場合を挙げることができる。組み合わせることが可能なアミノ酸置換数は、「本発明の四面構造を示す18アミノ酸配列」という要件を満足する限り特に制限はない。好ましくは18アミノ酸当り3以下である。

例えば、実施例12及び13は、本発明に用いるペプチドが前述の「本発明の四面構造を示す18アミノ酸配列」という要件を満足する限り相互置換することが可能であることを示している。

【0071】

本発明に用いるペプチドとして、配列番号1～24のいずれかのアミノ酸配列からなるペプチドを例示する。好ましくは、配列番号16又は19のいずれかのアミノ酸配列からなるペプチドである。

本発明に用いるペプチドは、核酸との結合能と、核酸を細胞へ導入する能力を有し、かつホスファチジルセリンに特異的に親和性を有するペプチドである。

また、ペプチドを構成するアミノ酸は、L体及びD体のアミノ酸いずれでもよく、かつ天然型アミノ酸と性質がほぼ同等の通常のアミノ酸以外のアミノ酸や合成修飾アミノ酸であってもよい。この中には例えばヒドロキシプロリン、ホモセリン、メチルシステインなどが含まれる。

【0072】

本発明は、上記 18 アミノ酸からなる配列を含むペプチド（本発明に用いるペプチド）と、該ペプチドを PEG で修飾して得られる、PEG 化学修飾ペプチドであるが、また、該 PEG 化学修飾ペプチドとペプチドと結合する物質（ペプチド結合物質）との複合体も含む。

本発明の第 2 態様は、該 PEG 化学修飾ペプチドとペプチドと結合する物質（ペプチド結合物質）との複合体である。

ここで、「複合体」とは、本発明に用いるペプチドと PEG とペプチド結合物質との凝集体、混合物、組成物であってもよい。

また、本発明に用いるペプチドに対する、PEG 及び／又はペプチド結合物質の結合位置もペプチドの機能を保持する限り特に限定されない。

実施例 30 の結果から、本発明に用いるペプチドと、PEG と、ペプチド結合物質とが複合体（凝集体、混合物、組成物等）を形成していることが分かる。

#### 【0073】

本発明の複合体を構成する「ペプチド結合物質」とは、上記したように、核酸、酸性蛋白質等の酸性高分子、負に荷電した側鎖（リン酸基等）を有する低分子化合物等で生理活性を有する物質等である。

ここで、「酸性蛋白質等の酸性高分子」とは、酸性アミノ酸を多く含み負に荷電している蛋白質（例えばアルブミン）や分子全体として負に荷電した状態にある蛋白質以外的高分子（例えばヘパリンやヒアルロン酸等）が例示される。

「負に荷電した側鎖を有する低分子化合物」とは、リン酸基等を側鎖に有する低分子化合物で、リン酸化されたアシクロビル等が例示される。

#### 【0074】

「核酸」とは、ヌクレオシドやヌクレオチド、ヌクレオチドが 2 個以上つながったオリゴヌクレオチド又はポリヌクレオチド、DNA、RNA あるいはこれらの誘導体、修飾体若しくは改変体などが含まれる。

「核酸の誘導体」には核酸を構成する原子の一部が他の原子に置換したものが含まれる。例えば、ホスホジエステル結合部位の酸素原子の一つを硫黄原子に置換したいわゆる PS 体が含まれる。

「核酸の修飾体」には核酸を構成する原子の一部に他の原子団が置換・付加し

たものが含まれる。例えば、核酸の五炭糖部位の 2' 部位にある炭素原子にメトキシ基 ( $-O-CH_3$ ) や、核酸配列の一部に糖、リン脂質やポリエチレングリコールが付加したものが含まれる。

「核酸の改変体」には期待される核酸の機能を維持しながら全く異なる骨格を有する分子が含まれる。例えば、ペプチド核酸 (Peptide Nucleic Acid; PNA) が含まれる。また、核酸の中には、生体内における特定の蛋白質の発現量を増減する、若しくは特定の因子の機能発現を調節するポリヌクレオチドである DNA や RNA、又はこれらの誘導体、修飾体若しくは改変体、あるいは「誘導」「修飾」「改変」が組合わさったもの、及びこれらの誘導体、修飾体若しくは改変体の混合物若しくはキメラ体などが含まれる。

#### 【 0 0 7 5 】

また、前記核酸は一本鎖でも二本以上の鎖から構成されていてもよく、担体に結合していてもよい。例えば、蛋白質をコードする DNA や該 DNA に発現調節ユニットが接続されたプラスミド、アンチセンスオリゴヌクレオチド、おとり型二本鎖核酸（以降デコイと記す）、アプタマー、リボザイムなどが挙げられる。

「特定の蛋白質」又は「特定の因子」とは、発現量を増減する、若しくは機能発現の調節を意図する蛋白質又は因子である。これらは、元来生体内に存在する物質であっても、存在しない物質であってもよい。

#### 【 0 0 7 6 】

「ペプチド結合物質と結合する能力」は、核酸を例にとって説明すれば、核酸と本発明に用いるペプチドのとの混合液を電気泳動した後、核酸の染色像を検出することにより調べることができる。例えば、核酸が泳動されず、核酸の染色像が得られない場合、若しくは、核酸のみの泳動の染色像と比較して、電気泳動時の移動度が小さい領域に染色像が得られる場合は、ペプチドが「ペプチド結合物質と結合する能力」を有しているとする。さらに具体的な方法として、後述する実施例 8 が例示される。

「ペプチド結合物質を細胞へ導入する能力」は、核酸を例にとって説明すれば、蛍光標識した核酸を用いて蛍光顕微鏡下で細胞を観察する方法若しくはレポーター遺伝子を発現するプラスミドを用いて細胞が発現するレポーター蛋白質を測

定する方法等により測定することができる。また、レポーター蛋白質が発現した結果として認められる薬理作用を指標として測定することもできる。レポーターとしては蛍ルシフェラーゼ、 $\beta$ -ガラクトシダーゼ若しくはHSV-tk等が挙げられる。さらに具体的な方法として、後述する実施例9が例示される。この方法を用いて細胞が発現する蛍ルシフェラーゼの量を測定する場合、蛋白質1mgの1秒当たりの蛍光カウント数を測定する。このときの蛍光カウント数が10,000以上の場合、レポーター遺伝子が細胞に導入されたとし、ペプチドは「ペプチド結合物質を細胞へ導入する能力」を有するとする。

なお、本明細書において、「細胞へ導入する」と「細胞内へ導入する」は同義語として記載する。

#### 【0077】

以下、本明細書において、「細胞内」とは、細胞を構成するユニット及びその内部を言う。例えば、細胞の輪郭を構成するリン脂質二重層内、リン脂質二重層間、細胞質、あるいはオルガネラ（細胞小器官）若しくは核又はそれらの内部が挙げられる。

「特異的に親和性を有する」とは、いずれかの特異的な相互作用をすることをいう。例えば、互いに結合すること、複合体を形成すること、互いに分子を認識すること、一定の方向へ移動若しくは集合しようとする、分子の形状が変化すること、又は互いに反応すること等が挙げられる。例えば、血清アルブミン存在下であっても親和性を有すれば、特異的に親和性を有することになる。

通常、ペプチドがある物質と相互作用をする場合でも、他のペプチドや蛋白質が共存することによってその相互作用が消失する場合は、その相互作用は非特異的である。すなわち、アルブミン等の蛋白質が多量に存在すると、非特異的な相互作用は消失する。したがって、例えば、血清アルブミン非存在下でホスファチジルセリンに親和性を有していても、血清アルブミン存在下ではホスファチジルセリンに親和性を有していないペプチドは、ホスファチジルセリンとの相互作用は非特異的であり、生体内ではホスファチジルセリンに親和性を有していない。

一方、他のペプチドや蛋白質が共存しても当該ペプチドの特定の物質に対する相互作用が消失しない場合は、相互作用は特異的であり、「特異的に親和性を有

する」ことになる。

【 0 0 7 8 】

以下、本発明に用いるペプチドの性質、特徴等、及び、本発明の P E G 化学修飾ペプチドの改良された性質、特徴等について、実施例等を参照して説明する。

なお、本発明の P E G 化学修飾ペプチドの改良された性質、特徴等には、本発明の P E G 化学修飾ペプチドとペプチド結合物質との複合体の性質、特徴等を含む。

本発明に用いるペプチド（P E G 修飾していない 1 8 アミノ酸からなる配列を含むペプチドをさす）及び本発明の P E G 化学修飾ペプチド（以下、両者を併せて「本発明のペプチド」と略記する）は核酸との結合能を有する。好ましくは、ペプチドの有する別の機能である核酸を細胞へ導入する能力及び血清アルブミン存在下でのホスファチジルセリンとの親和性、並びに核酸の保持する機能のいずれもが完全には損なわれることなく、該ペプチドと核酸とが実質的に一体となって複合体を形成する能力を有するペプチドである。

本発明のペプチドの核酸との結合における結合様式には何ら制限はなく、静電的な結合や疎水結合、及び共有結合が含まれる。

【 0 0 7 9 】

本発明のペプチドは、上記複合体を形成し、該ペプチドと結合した核酸を細胞へ導入する能力を有し、好ましくは、核酸が分解を受けずに、核酸の所望の機能を保持した状態で核酸を細胞内へ導入する能力を有する。

本発明に用いるペプチドの核酸導入能は、具体的には、実施例 9 の核酸導入能の測定において、測定値は蛋白質 1 m g の 1 秒当たりの蛍光カウント数が 1 0 , 0 0 0 以上である。好ましくは 1 0 0 , 0 0 0 以上であり、より好ましくは 1 , 0 0 0 , 0 0 0 以上である。

【 0 0 8 0 】

本発明のペプチドが前記特徴を有することにより、該ペプチドを使用して、核酸を細胞内へ導入したときに、結果として、核酸が保持する所望の機能を細胞内で発揮することが可能である。例えば、プラスミドに挿入された外来遺伝子が細胞内で発現して所望の蛋白質が産生されること、又は、アンチセンスオリゴヌク

レオチド、デコイ、アプタマー若しくはリボザイム等によって特定の生理活性物質の産生が抑制されること等が挙げられる。なお、「所望の蛋白質」には最終的な活性体のみならず前駆体も含まれる。

## 【 0 0 8 1 】

後述する実施例 1 1 及び実施例 2 4 はプラスミドに組み込まれた蛍ルシフェラーゼ遺伝子が、本発明に用いるペプチドにより、細胞内に導入された後、転写・翻訳の過程を経て細胞内に蛍ルシフェラーゼが産生・蓄積している具体例である。また、実施例 1 6 及び実施例 2 5 は、プラスミドに組み込まれた単純ヘルペスウイルス由来のチミジンキナーゼ（以降 HSV-tk と記す）遺伝子が、本発明に用いるペプチドにより、腫瘍細胞内に導入された後、転写・翻訳の過程を経て腫瘍細胞内に HSV-tk が産生・蓄積し、腫瘍細胞のガンシクロビル感受性を亢進して薬効（抗腫瘍効果）を示した具体例である。

## 【 0 0 8 2 】

さらに本発明のペプチドの好ましい例は、血清アルブミン存在下でホスファチジルセリンに特異的に親和性を有し、ホスファチジルセリン以外のリン脂質、例えばホスファチジルコリン、に親和性を有しないペプチドである。

ホスファチジルセリン以外のリン脂質とは親和性を有しない、好ましい本発明のペプチドとホスファチジルセリンとの相互作用、すなわち結合は、電荷による結合又は非特異的結合による結合のみではなく、該ペプチドがホスファチジルセリンの分子構造を認識する結合である。

このことは、例えば、本発明に用いるペプチドについて、実施例 2 0 又は実施例 2 1 に示されている。

ホスファチジルセリンは、前述の通り、細胞表層を形成する脂質二重層の構成成分に含まれるリン脂質であり、脂質二重層の外層と内層に含まれる比率が細胞の状態によって変化するリン脂質であるので、例えば、損傷を受けたり変性したり活性化された、炎症部位の細胞等のいわゆる正常でない細胞において脂質二重層の外層に含まれる割合が増加すると考えられるリン脂質である。したがって、本発明のペプチドは選択的に炎症部位の細胞等の正常でない細胞に結合する。さらにホスファチジルセリンは、生体内においても、血液凝固反応が進行する「場

」を提供したり、マクロファージがアポトーシスに陥った細胞を認識して貪食する際の目印となっているリン脂質である。したがって、本発明のペプチドは選択的に正常でない細胞、例えば生体内において血液凝固反応が進行する「場」に結合する。

### 【0083】

このように、本発明のペプチドは、核酸との結合能と、該核酸を細胞へ導入する能力を有し、かつ血清アルブミン存在下でホスファチジルセリンに親和性を有することを特徴とする。

本発明のペプチドは、含有物なし、又は無機塩のみを含む水溶液中では不規則な構造を示すが、特定の物質の共存下では、 $\alpha$ -ヘリックス構造が認められるペプチドであるのが好ましい。

「特定の物質」とは本発明のペプチドと相互作用して該ペプチドが $\alpha$ -ヘリックス構造を取ることを誘起する物質である。例えば、両親媒性物質であり、この中にはドデシル硫酸ナトリウム (SDS) 等の界面活性剤又はホスファチジルセリン等の特定のリン脂質が含まれる。

ペプチドの高次構造中における $\alpha$ -ヘリックス構造の有無は、一般的にCDスペクトル測定によって知ることができる。すなわち、ペプチドの高次構造中に $\alpha$ -ヘリックス構造が含まれる場合、CDスペクトル測定の平均残基楕円率曲線が、 $\alpha$ -ヘリックス構造の特徴である曲線、すなわち、波長205～210nmの領域及び波長220～225nmの領域の二ヶ所に極小値が認められるいわゆるW字型の曲線となる（「タンパク質の旋光性（生物化学実験法6）、浜口浩三ら著、学会出版センター、1979」）。なお、ペプチドの高次構造中に $\alpha$ -ヘリックス構造が含まれる割合は、測定された平均残基楕円率曲線から所定の計算方法によって得ることができる。所定の計算方法としては、代表的なものとして、Chen等の方法 (Y. H. Chen et al., Biochemistry Vol. 11, 4120 (1972))、Yang等の方法 (J. T. Yang et al., Anal. Chem., Vol. 91, 13 (1978))、Woody等の方法 (R. W. Woody et al., J. Mol. Biol., Vol. 242, 497 (1994))などを挙げるができる。

ただし、用いる方法によって算出される数値が異なるので、算出された数値と共に、算出に用いた方法を明記することが好ましい。

#### 【0084】

上述したように、本発明の好ましいペプチドは、特定の物質の共存下では、 $\alpha$ -ヘリックス構造を取り、例えば、該ペプチドは界面活性剤又は細胞膜上のホスファチジルセリン等の特定のリン脂質等の両親媒性物質との相互作用によって $\alpha$ -ヘリックス構造を取る。それにより該ペプチド及び該ペプチドを含む物質の細胞膜透過性が上昇し、結果的に該ペプチド及び該ペプチドを含む物質が速やかに細胞内に移行する。

要するに、本発明のペプチドの好ましい例は、pH 5～8の、含有物なし、又は無機塩のみを含む水溶液中でのCDスペクトル測定では $\alpha$ -ヘリックス構造が認められないが、pH 5～8の5 mM SDS含有水溶液中でのCDスペクトル測定では、平均残基楕円率曲線の波長205～210 nmの領域及び波長220～225 nmの領域の二ヶ所に極小値を示し、それにより、 $\alpha$ -ヘリックス構造が認められるペプチドである。

また、高次構造中の $\alpha$ -ヘリックス構造の含有割合が、Chen等の方法によって計算した場合に25%以上であるペプチドが好ましい。より好ましくは30%以上であるペプチドである。さらに好ましくは35%以上であるペプチドである。

#### 【0085】

上記本発明のペプチドは両親媒性物質存在下の水溶液中で $\alpha$ -ヘリックス構造が認められる。またホスファチジルセリンに親和性を有することから、正常でない細胞、例えば損傷を受けたり変性したり活性化された細胞の表面に選択的に集積し、該細胞膜上のホスファチジルセリンとの相互作用により $\alpha$ -ヘリックス構造をとり、該細胞内に選択的に取り込まれる。

また、本発明のペプチドは、蛋白質共存下で実質的に凝集体を形成しないペプチドが好ましい。

例えば、上記の好ましいペプチドの例においては、両親媒性物質が存在しなければ $\alpha$ -ヘリックス構造を取らず、蛋白質共存下においても溶解性が保持される



。そのため、該ペプチドをヒトに投与しても、該ペプチドは実質的に問題となるような凝集体を血液中で形成せず、血管閉塞を起こすことがなく、安全性が高まる。例えば、本発明に用いるペプチドについて、安全性が高いことは実施例 26 に示されている。

また、本発明の PEG 化学修飾ペプチドは、さらに安全性が高い。

#### 【0086】

本発明のペプチドが蛋白質共存下で実質的に凝集体を形成するか否かは、該ペプチドを含む血清アルブミン水溶液の濁度を光学的に測定することで判定することができる。例えば、波長 340 nm ~ 660 nm、特に波長 600 nm での該ペプチドを含む血清アルブミン水溶液の吸光度を測定することにより判定できる。

本発明のペプチドは、核酸と容易に結合するという特徴、核酸との複合体形成時に溶解性が高いという特徴、核酸を細胞内に導入する能力が高いという特徴、安全性が高いという特徴、及び、血清アルブミン存在下でホスファチジルセリンに親和性を有するので、正常でない細胞内へ選択的に取り込まれるという特徴を有するのでペプチドベクターとして有用である。

「ペプチドベクター」とは、所望の物質を細胞内へ導入することができるペプチドならびにその誘導体、修飾体及び改変体である。

#### 【0087】

さらに本発明のペプチドは、核酸のヌクレアーゼによる分解を防ぐことができるという特徴を有する。このため、天然型 (P=O 体) のオリゴヌクレオチドやポリヌクレオチドは、血液中及び細胞中に存在するヌクレアーゼによって容易に分解されるが、本発明のペプチドが結合すればヌクレアーゼによる分解を受けない。

核酸にヌクレアーゼ耐性を付与するか否かは、ヌクレアーゼが存在する溶液中で核酸と本発明のペプチドとの複合体を反応させた後、核酸を抽出して電気泳動し、核酸の染色像を検出することにより調べることができる。例えば、ペプチドが核酸にヌクレアーゼ耐性を付与すれば、核酸は分解されないで核酸の染色像が得られる。具体的な方法は後述する実施例 18 及び実施例 19 に記載した。

本発明のペプチドをペプチドベクターとして使用することにより、該ベクターと結合する物質、好ましくは核酸を細胞内へ導入すること、及び核酸を細胞内へ導入して該核酸が有する機能を細胞内で発現させることができる。

【0088】

実施例11から実施例16は本発明に用いるペプチドが *in vitro* で核酸を細胞内へ導入することにより該核酸がコードする蛍ルシフェラーゼ及び HSV-tk を細胞内で発現させた例であり、実施例24及び実施例25は本発明に用いるペプチドが *in vivo* で核酸を細胞内へ導入することにより該核酸がコードする蛍ルシフェラーゼ及び HSV-tk を細胞内で発現させた例である。特に実施例25は、本発明に用いるペプチドによって腫瘍細胞内に導入された HSV-tk 遺伝子が腫瘍細胞内で発現し、腫瘍細胞のガンシクロビル感受性を亢進して薬効（抗腫瘍効果）を示した具体例であるが、本実施例で使用したプラスミドの用量は  $10\mu\text{g}$  であり、該使用量は既報のリポソームベクターを利用して行われた同様の薬理実験（Aoki, K. et al., Hum. Gene Ther., Vol. 8, 1105 (1997)）で使用された用量（ $150\mu\text{g}$ ）よりも遥かに低用量である。これは、実施例17及び実施例18に例示されるように、本発明に用いるペプチドは核酸の安定性をリポソームよりも上昇させ、かつ、本発明に用いるペプチドと核酸との結合体は安定性がリポソームよりも高いので、核酸を細胞内へ導入する際に本発明に用いるペプチドを用いることが有用で、核酸を細胞内へ導入するベクターとして本発明に用いるペプチドが優れていることを示している。

そして、上記の優れた性質を有するペプチドを含む、本発明のPEG化学修飾ペプチドは、さらに優れた上記性質を示す。

【0089】

本発明のペプチドをベクターとして使用する他の例を挙げれば、

レポーター蛋白質（緑色蛍光蛋白質（GFP）や $\beta$ -ガラクトシダーゼ）を発現するプラスミド、

抗腫瘍効果を示すサイトカイン（インターロイキン2、インターフェロン $\beta$ 等）を発現するプラスミド、

アポトーシスを誘導して細胞殺傷効果を示す生理活性物質（Fasリガンド、p53、カスパーゼ3、カスパーゼ8、Bax（Bcl-2-associated X protein）、FADD（Fas associated death domain protein）等）を発現するプラスミド、

TNF- $\alpha$ 若しくはインターロイキン6等のリガンドに競争的に結合することにより該リガンドが誘起する反応を抑制して、例えば慢性関節リウマチ等の病態を改善することができる該リガンドに対する可溶型の受容体を発現するプラスミド、

ワクチンとしてアレルギー反応を抑制するペプチド／ポリペプチド若しくは例えばダニ抗原等の抗原蛋白である蛋白質を発現するプラスミド、

循環器疾患である閉塞性動脈硬化症の病態の改善あるいは損傷部位の回復（リモデリング）を推進する効果がある血管内皮細胞増殖因子（VEGF）若しくは肝細胞増殖因子（HGF）を発現するプラスミド、

経皮的冠動脈形成術（PTCA）後の再狭窄を抑制する効果があるCDC2キナーゼに対するアンチセンスオリゴヌクレオチドやリボザイム、及び、

細胞周期調節遺伝子の転写調節因子であるE2Fや炎症性サイトカインの転写調節因子であるNF $\kappa$ Bが結合する核酸配列に対するデコイ、ならびに、

抗ウイルス効果を示すリン酸化された核酸アナログの活性化体などを細胞内へ導入すること、及び、それらの機能を細胞内で発現させることが可能となる。

#### 【0090】

本発明のペプチドは、核酸との結合能と、該核酸を細胞へ導入する能力を有し、かつ血清アルブミン存在下でホスファチジルセリンに親和性を有することを特徴とするので、ホスファチジルセリンをより多く細胞表層へ表出させている細胞により高率に核酸を導入できる。このことにより、疾病の治療を目的として遺伝子若しくはアンチセンスDNA等の核酸を細胞へ導入しようとする場合に、ホスファチジルセリンの細胞表層への表出量が増加した損傷を受けたり変性したり活性化された炎症細胞等の、いわゆる正常でない細胞、免疫担当細胞に、より多くの該核酸が選択的に導入されることになり、すなわち副作用を低減することがで

きる。

具体的な例を挙げれば、本発明のペプチドをベクターとして用いて腫瘍細胞に核酸を導入して癌治療を行う場合、正常細胞には核酸はほとんど導入されず、腫瘍細胞に高率に核酸が導入される。また、アレルギーの治療を目的として核酸を細胞へ導入しようとする場合、免疫担当細胞によりアレルギー反応が惹起された細胞に特異的に核酸が導入される。

【0091】

さらに、本発明のペプチドが有する「ホスファチジルセリンをより多く細胞表層へ表出させている細胞により高率に核酸を導入する」という性質を利用して、あらかじめ所望の特定の細胞や臓器におけるホスファチジルセリンの表出量を増加させておくことにより、所望の特定の細胞や臓器により高率に核酸を導入することができる。例えば、特定の細胞・臓器に薬剤を作用させることにより該細胞・臓器は薬剤の薬理作用によりホスファチジルセリンの表出量を増加させた上で、本発明のペプチドをベクターとして用いることにより該細胞・臓器へ高率に核酸を導入することができる。

具体的な例を挙げれば、化学療法による癌治療において抗癌剤の服用のみでは十分に治療効果が表われない場合であっても、該化学療法剤を服用させて、該化学療法剤の薬理効果により腫瘍細胞をホスファチジルセリンの表出量を増加させた上で、本発明のペプチドをベクターとして用いて高率に抗腫瘍効果を示す遺伝子若しくはアンチセンスDNA等の核酸を腫瘍細胞に導入することにより、該核酸の治療効果を上げることができる。

【0092】

本発明のペプチドは核酸と容易に結合し、該核酸を細胞内へ導入する。また、本発明のペプチドは、核酸のみならずペプチド結合物質を細胞内へ導入することが可能である。本発明のペプチドと核酸との結合の形態が特に限定されないことと同様に、本発明のペプチドと該物質との結合の形態もとくに限定されない。好ましくは、該物質を細胞内へ導入する時の本発明のペプチドと該物質の結合形態が非共有結合によることであり、さらに好ましくは静電的結合によることである。特に好ましくは、本発明のペプチドが有する正電荷と、該物質が有する負電荷

による静電的結合によることである。すなわち、本発明には上記の結合形態によりペプチド結合物質を細胞内に導入することが含まれる。

【 0 0 9 3 】

なお、本発明に用いるペプチドと本発明の P E G 化学修飾ペプチドの性質、特徴について併せて説明したが、本発明の P E G 化学修飾ペプチドは、本発明に用いるペプチドを P E G で化学修飾しているため、本発明に用いるペプチドに対して、例えば、標的細胞への遺伝子の取り込み率の向上、薬理活性の向上、毒性の低減等の優れた効果を有する。

具体的には、後述する実施例 2 8 及び 2 9 の結果から、本発明に用いるペプチドを活性化 P E G で修飾しても、比活性が低下せず（実施例 2 8）、また、ペプチド結合物質の導入率が、約 3 倍程度向上（実施例 2 9）し、有用である。

【 0 0 9 4 】

本発明の P E G 化学修飾ペプチドの製法について、以下述べる。

本発明に用いるペプチドは、化学合成によって得ることができる。

例えば、自動ペプチド合成機（4 3 2 A 型、アプライドバイオシステムズ社製）を用いて合成することにより得ることができる。

また、本発明に用いるペプチドは遺伝子工学的手法によって得ることもできる。遺伝子工学的手法による場合、以下の工程を行うことにより、所望のペプチドを得ることができる。

（1）当該ペプチドのアミノ酸配列をコードする塩基配列を有する D N A を得る工程、

（2）ベクターに当該 D N A を組み入れて、当該 D N A を含む複製可能な組換え D N A を得る工程、

（3）当該組換え D N A で宿主細胞を形質転換させて、当該ペプチドを発現し得る形質転換体を得る工程、

（4）該形質転換体を培養して、当該ペプチドを産生せしめ、培養混合物から当該ペプチドを回収する工程、

【 0 0 9 5 】

本発明に用いるペプチドをコードする D N A は、実質的に本発明に用いるペプ

チドをコードする塩基配列を有するものであればいずれでもよい。公知のように、遺伝暗号の縮重に従い、遺伝子からコードされるペプチドのアミノ酸配列を変えることなくその遺伝子配列の少なくとも一つの塩基を他の塩基に置換することができる。したがって、該DNAは、遺伝子コードの縮重に基づき、塩基配列の一個以上の塩基が置換された塩基配列を有していてもよい。特に、本発明に用いるペプチドを遺伝子工学の手法を用いて製造する際に、特定の宿主細胞で使用頻度の高いコドンとなるように一個以上の塩基を置換した塩基配列を有していてもよい。また該DNAは組換えDNA、例えばプラスミド、発現ベクターでもよい。

#### 【0096】

配列番号1、16、19のペプチドをコードする配列番号28～30のDNAを例示する。

当該ペプチドのアミノ酸配列をコードする塩基配列を有するDNAを得る工程は例えば、自動核酸合成機を用いて合成することにより得ることができる。

ベクターに当該DNAを組み入れて、当該DNAを含む複製可能な組換えDNAを得る工程、及び、当該組換えDNAで宿主細胞を形質転換させて、当該ペプチドを発現し得る形質転換体を得る工程は成書（例えば、Molecular Cloning, a laboratory manual, Second edition, T. maniatitis et al., Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989)）に記載された一般的な遺伝子工学の手法に基づいて実施することが可能である。なお、本発明に用いるペプチドは、メチオニンを含まないよう設計することが可能なので、メチオニンを介在させて複数の本発明のペプチドが連結したペプチドを遺伝子工学的に産生した後ブロムシアンで切断して得ることも可能である。

#### 【0097】

生産される当該ペプチドは、多くの文献や成書（例えば、「新生化学実験講座1：タンパク質I」（日本生化学会編、東京化学同人、1990年）、「化学増刊102：タンパク質・ペプチドの高速液体クロマトグラフィー」（宇井信生ら編、化学同人、1985年））に記載された方法を参考にして、精製、単離及び

回収することができる。すなわち、脱塩、濃縮、塩析、限外ろ過、イオン交換クロマトグラフィー、逆相クロマトグラフィー、等電点クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー及びゲルろ過のうちから選ばれる少なくとも一つの方法を用いて当該ペプチドを純粋な形で得ることができる。

## 【0098】

本発明のPEG化学修飾ペプチドは、上記方法により得られる本発明に用いるペプチドを上記のPEGで化学修飾して得られる。

PEG化学修飾条件は特に限定されず、当業者に公知の方法を適宜選択できる。

具体的には、それぞれ適当な溶媒に溶解したペプチド溶液と活性化PEG溶液とを混合し、約1～約40℃で、約1分～約24時間程度反応させる。

なお、PEG化学修飾後、通常用いられる方法、条件で、精製することもできる。

## 【0099】

上記製造方法において、活性化PEGの使用量は、本発明に用いるペプチドの量に対してモル比で0.0001～10000であり好ましくは0.01～100であり、特に好ましくは0.1～10である。この範囲であれば、活性化PEGはペプチドと反応しても、PEG化学修飾ペプチドは元のペプチドの活性を維持し、かつ溶解性を更に上げる、抗原性を減弱する、毒性を減弱するなど、より好ましい性質を付与することが可能だからである。

## 【0100】

PEG化学修飾ペプチドのPEG部分の平均分子量は、約200Da～約100,000Daであり、好ましくは、約1,000Da～約50,000Da、さらに好ましくは、約2,000Da～約20,000Daである。

この範囲であれば、PEG化学修飾ペプチドは元のペプチドの活性を維持し、かつ溶解性を更に上げる、抗原性を減弱する、毒性を減弱するなど、より好ましい性質を付与することが可能である。

## 【0101】

本発明のPEG化学修飾ペプチドとペプチド結合物質との複合体の製造法につ

いて、以下述べる。

該複合体の製造方法は、上記した、本発明に用いるペプチド、活性化 P E G 及びペプチド結合物質を用いて、

I) a) 18 アミノ酸からなる配列を含むペプチドと、活性化ポリエチレングリコール (P E G) とを反応させる工程、

b) 前記 a) により得られる P E G 化学修飾ペプチドと、ペプチドと結合する物質とを反応させる工程、

よりなる製造方法、

又は、

II) a) 18 アミノ酸からなる配列を含むペプチドと、ペプチド結合物質と反応させる工程、

b) 該ペプチドと該ペプチド結合物質との反応物を、活性化 P E G と反応させる工程、

よりなる製造方法である。

ペプチドと該ペプチド結合物質との反応物を予め形成し、反応物を P E G 修飾することにより不必要な P E G 修飾を抑制することができるため、II) の方法が好ましい。

# 【 0 1 0 2 】

この II) の方法を用いれば、P E G 修飾によってペプチドの機能が発揮されるために必要な部位 (ペプチドの活性中心) が覆われてしまったり、ペプチドの構造が変化し標的に近づけないなど比活性の低下をもたらす不必要な P E G 修飾を抑制することが可能であり、P E G 修飾の有用性を更に向上させることができる。

方法 I) の a) における反応条件は、上記本発明の P E G 化学修飾ペプチドの製造条件を選択でき、I) の b) における反応条件は、後述する II) の a) と同様の条件を選択できる。

方法 II) の工程 a) の反応条件は特に限定されず、該反応物が形成できる条件を任意に選択でき、具体的には、それぞれ適当な溶媒に溶解したペプチド溶液と該ペプチド結合物質の溶液とを約 1 ～ 約 4 0 ℃ で、約 1 分 ～ 約 2 4 時間程度混



合させる条件が挙げられる。

方法 I I) の工程 b) の反応条件は特に限定されず、該複合体が形成できる条件を任意に選択でき、具体的には、上記した、本発明に用いるペプチドの P E G 化学修飾の条件が挙げられる。

より具体的には、実施例 2 7 に記載されている。

#### 【 0 1 0 3 】

該製造方法に用いられる、本発明に用いるペプチド、活性化 P E G 及びペプチド結合物質の量比は、該複合体が用いられる用途、該複合体に要求される性質、特徴、薬理活性、安全性等を考慮して任意の比率とすることができる。

具体的には、方法 I I) の工程 a) で用いるペプチド結合物質は、該ペプチドが有する正電荷 (+) の個数とペプチド結合物質が有する負電荷 (-) の個数との比 (+/- 比) が 2 以上となるよう、より好ましくは 3 以上となるよう使用する。また、該比は好ましくは 1 0 0 以下であり、より好ましくは 5 0 以下である。その範囲であれば、ペプチドとペプチド結合物質が複合体を形成することができる。

方法 I I) の工程 b) で用いる活性化 P E G は、本発明に用いるペプチドの量に対してモル比で 0. 0 0 0 1 ~ 1 0 0 0 0 であり好ましくは 0. 0 1 ~ 1 0 0 であり、特に好ましくは 0. 1 ~ 1 0 である。この範囲であれば、活性化 P E G はペプチドと反応しても、P E G 化修飾ペプチドは元のペプチドの活性を維持し、かつ溶解性を更に上げる、抗原性を減弱する、毒性を減弱するなど、より好ましい性質を付与することが可能だからである。

また、当該方法により製造される、本発明の P E G 化学修飾ペプチドと、ペプチド結合物質との複合体、上記 3 成分の混合物、組成物、凝集体等も本発明に含まれるのはいうまでもない。実施例 3 0 の結果から、本発明に用いるペプチドと、P E G と、ペプチド結合物質とが複合体（凝集体、混合物、組成物等）を形成していることが分かる。

#### 【 0 1 0 4 】

##### 【実施例】

以下、実施例を用いて、本発明をさらに具体的に説明するが、これらは実施の

一例として示すものであり、本発明はこれらにより何ら限定されるものではない。また、以下の記載において用いる略号は当該分野における慣例略号に基づくものである。

## 【0105】

## ＜実施例1＞ペプチドの化学合成

配列番号1～27のアミノ酸配列を有するペプチドを、自動ペプチド合成機（432A型、アプライドバイオシステムズ社製）を用いて固相合成した。なお、30残基以上の長さを有するペプチドの合成は、25残基目のアミノ酸が脱保護されない状態で合成を中断し、26残基目以降のアミノ酸カラムを合成機に装着し直した後合成を再開させて合成を遂行した。他の操作方法については、特に明記しない限り添付の操作マニュアルに従った。切り出し、脱保護反応を行い、エーテル中でペプチドを沈殿させた後、エーテルを除去し、蒸留水に溶解させて凍結乾燥した。続いて、配列番号1～26のペプチドは10mM HClを含む20%アセトニトリル水溶液で、配列番号27のペプチドは10mM HClを含む15%アセトニトリル／15%イソプロパノール水溶液で各々溶解し、C18カラム（CAPCELLPAK C18AG120、資生堂社製）、高速液体クロマトグラフィー（625LCシステム、ウォーターズ社製）を用いて、配列番号1～26のペプチドは10mM HClを含む20%～70%アセトニトリル水溶液で直線濃度勾配法により単一ピークが得られるよう精製し、配列番号27のペプチドは10mM HClを含む15%～50%アセトニトリル／15%～50%イソプロパノール水溶液で直線濃度勾配法により単一ピークが得られるよう精製した。精製ペプチドは凍結乾燥した後蒸留水に溶解させ、凍結保存した。

収量は、それぞれ30mg～40mgであった。

## 【0106】

## ＜実施例2＞ペプチドの検定（1）

MALDI-TOFMS型質量分析計（VoyagerDE-STR、PEバイオシステムズ社製）を用いて、質量分析により得られた合成ペプチドの分子量を測定し、ペプチドが目的物であることを検証した。操作方法については、特に

明記しない限り添付の操作マニュアルに従った。概略は以下のとおりである。

すなわち、まず、 $\alpha$ -cyano-4-hydroxycinnamic acid (CHCA) を 0.1 vol% TFA/50 vol% アセトニトリル/純水で溶解し、10 mg/mL のマトリックス溶液を調製した。つぎに、サンプルプレート上で、実施例 1 に記載の方法で取得したペプチド水溶液 (10 pmol/ $\mu$ L) 0.5  $\mu$ L とマトリックス溶液 0.5  $\mu$ L とを混合し、乾燥させて試料を結晶化したのち、以下の条件で分析を行った。

測定モード: Linear, positive

キャリブレーション: 外部標準法 (ただし、標準品は①Angiotensin I、②ACTH (1-17 clip)、③ACTH (18-39 clip)、④ACTH (7-38 clip)、⑤Insulin (bovine))

その結果、合成及び精製したいずれのペプチドの分子量も理論分子量と一致することが確認できた。

【0107】

#### <実施例 3> ペプチドの検定 (2)

アミノ酸組成分析により、実施例 1 で得られた合成ペプチド溶液の濃度を決定した。アミノ酸組成分析はニンヒドリン法により行った。

すなわち、試料をガラス試験管中で乾固し、6N HCl 100  $\mu$ L を添加、真空封管下、110℃で22時間加水分解を行った。試料を乾固後、純水に溶解しアミノ酸分析計 (L-8500 型、日立社製) を用いて分析を行った。ペプチド水溶液の濃度は 7~10 mg/mL であった。

【0108】

#### <実施例 4> BSA 中での濁度測定

牛血清アルブミン (BSA) 濃度 1%、ペプチド濃度が 50  $\mu$ M となるよう水溶液を調製し、分光光度計 (DU640 型、ベックマン社製) を用いて波長 600 nm における吸光度を測定した。その結果を表 1 に示したが、いずれも 0.1 以下であった。

【0109】

【表1】

表1

配列番号	OD600
配列番号1	0.03
配列番号2	0.01>
配列番号3	0.01>
配列番号5	0.01>
配列番号6	0.01>
配列番号7	0.01>
配列番号8	0.01>
配列番号10	0.01>
配列番号11	0.01>
配列番号15	0.01>
配列番号16	0.01>
配列番号17	0.01>
配列番号19	0.01>
配列番号23	0.01>

【0110】

&lt;実施例5&gt;CDスペクトルの測定

50mM NaClを含む10mMリン酸緩衝液(pH=7)中に溶解させた

ペプチドのCDスペクトルを、5 mM SDS存在下、非存在下で円二色性分散計（J-500A型、日本分光社製）を用いて測定した。なお、セル長は1 mm、35℃、積算回数6回で行った。

図7～図9は、各々配列番号1、配列番号4及び配列番号16のペプチドのCDスペクトル測定による平均残基楕円率曲線を示す図であり、図から明らかなように、SDS存在下のものの平均残基楕円率曲線では、波長205～210 nmの領域と、波長220～225 nmの領域に極小値を認められるいわゆるW型の曲線となり、 $\alpha$ -ヘリックス構造を取っていることが確認できる。

すなわち、遺伝子導入能が認められた配列番号1、配列番号4及び配列番号16のペプチドでは、無機塩のみを含む水溶液中では $\alpha$ -ヘリックス構造をとらないが、SDS存在下では $\alpha$ -ヘリックス構造をとることが示された。

【0111】

#### <実施例6>オリゴヌクレオチドの合成

21 mer長の未標識オリゴヌクレオチドは、OPCカラム（アプライドバイオシステムズ社製）を用いて精製した調製物を、FITC標識した21 merのオリゴヌクレオチドは、逆相クロマトグラフィーを用いたHPLC法により精製した調製物を、各々（株）サワデー・テクノロジー社に合成委託し入手した。

【0112】

#### <実施例7>Plasmidの調製

蛍ルシフェラーゼ遺伝子をレポーター遺伝子とした発現プラスミドは、SV40初期プロモーター下に蛍ルシフェラーゼ遺伝子が組み込まれた市販のプラスミド（pGL3-Control Vector、プロメガ社製）又はCMV初期プロモーター下に蛍ルシフェラーゼ遺伝子が組み込まれたプラスミド（pCMV-Luc（F））若しくはEF-1 $\alpha$ プロモーター下に蛍ルシフェラーゼ遺伝子が組み込まれたプラスミド（pEF-Luc（FEF-1 $\alpha$ プロモーター下にHSV-tk遺伝子が組み込まれたプラスミド（pEF-tk）））を使用した。HSV-tk遺伝子をレポーター遺伝子とした発現プラスミドは、EF-1 $\alpha$ プロモーター下にHSV-tk遺伝子が組み込まれたプラスミド（pEF-tk）又はCMV初期プロモーター下にHSV-tk遺伝子が組み込まれたプラスミド

(pCMV-tk)を使用した。これらのプラスミド及び汎用プラスミドであるpUC119及びpBR322は、必要に応じて大腸菌を用いて増幅させたのち、公知の方法に従って精製して使用した。

#### 【0113】

#### ＜実施例8＞核酸との結合能の評価

##### (1) オリゴヌクレオチドとの結合能の評価

150 mM NaClを含む20 mMトリス塩酸緩衝液(pH=7.2)中で、実施例6に記載の方法によって調製した21merからなるオリゴヌクレオチド(終濃度6.7  $\mu$ M)と、実施例1～3に記載の方法によって調製した各ペプチドを電荷比(+/-比)が0～10となるよう混合し、37℃、30分静置した。続いて、この溶液7.5  $\mu$ Lと等量の80%ホルムアミド含有トリス-ホウ酸緩衝液(pH=8.2)とを混合して、7M尿素を含有する25%ポリアクリルアミドゲルにて電気泳動を行った。泳動後、ゲルを、50%ホルムアミドを含む5%Stains all(フナコシ社製)水溶液で染色・水洗してオリゴヌクレオチドとペプチドとの結合の有無を判定した。

図10に配列番号1のペプチドを用いた場合の電気泳動図を示す。図10で+/-比(電荷比)は、ペプチドの正電荷を有する基の個数(+)と、核酸の有する負電荷の基の個数(-)を比で表したものである。図から明らかなように、電荷比(+/-比)が増加するにしたがってオリゴヌクレオチドのペプチドへの結合量は増加し、電荷比(+/-比)10で完全に結合した。同様に、配列番号2～24のペプチドにおいても電荷比(+/-比)10において結合が認められた。

#### 【0114】

##### (2) プラスミドとの結合能の評価

150 mM NaClを含む20 mMトリス塩酸緩衝液(pH=7.2)中で、実施例7に記載の方法によって調製したプラスミド(pUC119:終濃度=20  $\mu$ g/mL)と、実施例1～3に記載の方法によって調製した各ペプチドを電荷比(+/-比)が0～3となるよう混合し、37℃、30分静置したのち、1%アガロースゲルを用いて電気泳動を行ってプラスミドとペプチドとの結合の

有無を判定した。

図11に配列番号1のペプチドを用いた場合の電気泳動図を示す。図11で+/-比（電荷比）は、ペプチドの正電荷を有する基の個数（+）とプラスミドの負電荷を有する基の個数（-）を比で表したものである。図から明らかなように、電荷比（+/-比）が増加するにしたがってプラスミドのペプチドへの結合量は増加し、電荷比（+/-比）3で完全に結合した。同様に、配列番号2～24のペプチドにおいても電荷比（+/-比）3において結合が認められた。

【0115】

#### <実施例9>核酸導入能の評価（1）

American Type Culture Collection (ATCC) より購入したサル腎臓由来株化細胞（Vero細胞）、ヒト膀胱癌細胞（T24細胞）、及び大日本製薬より購入したヒト肺癌細胞（A549細胞）を24ウェル培養プレート（ナルジェヌンク社製）に1ウェルあたり $1 \times 10^5$ 細胞の割合で植え込み、Vero細胞とA549細胞は10%ウシ胎児血清（以降FBSと記す：ニチレイ社製）含有DMEM（ライフテックオリエンタル社製）で、T24細胞は10%FBS含有McCoy's 5a（ライフテックオリエンタル社製）で5%CO<sub>2</sub> 雰囲気下、37℃で24時間培養した。培地を除去した後、実施例7で調製したルシフェラーゼ発現プラスミド濃度が1  $\mu$ g/mLになるよう、及び、実施例1で調製したペプチド濃度が1.25、2.5、又は5  $\mu$ Mとなるように調製したopti-MEM（ライフテックオリエンタル社製）を添加して5時間培養した。続いて、Vero細胞とA549細胞は、培地を10%FBS含有DMEMに、またT24細胞は10%FBS含有McCoy's 5aに置換して5%CO<sub>2</sub> 雰囲気下37℃でさらに24時間培養した後、ルシフェラーゼアッセイシステム（プロメガ社製）の方法に準じて細胞内で発現しているルシフェラーゼ活性を測定した。すなわち、細胞をリン酸緩衝生理食塩水（以降PBSと記す：SIGMA社製）で洗浄し、キットに付属しているPassive Lysis Bufferで細胞を溶解した。

この細胞溶解液20  $\mu$ Lとキットに付属のLuciferase Assay Reagent II 100  $\mu$ Lとを蛍光測定用プレート（Microlit

e<sup>TM</sup><sub>1</sub> plate : ダイナテック社製) に添加して混和後、マルチラベルカウンター (ARVO<sup>TM</sup> SY1420MULTI LABEL COUNTER : ワラックベルトールド社製) を用いて蛍光を1秒間測定した。

【0116】

細胞溶解液中のタンパク質濃度は、デイスポーザブルキュベット (UVケイコウキュベットA204X : フナコシ社製) 中で、超純水792  $\mu$ Lに細胞溶解液8  $\mu$ Lとプロテインアッセイ溶液 (バイオラッド社製) 200  $\mu$ Lを混和後、5分間、室温で静置し、分光光度計 (DU640 : ベックマン社製) で595 nmの吸光度で測定した。スタンダードタンパク質はウシ血清アルブミン (BSA) を用いた。以上の結果から細胞溶解液中のタンパク質1 mgあたり、1秒あたりのカウント数を算出してルシフェラーゼ活性とし、ペプチド濃度が異なる3条件の中で最も高い値を示したものをそのペプチドの遺伝子導入能とした。

【0117】

#### <実施例10>核酸導入能の評価 (2)

Vero細胞をチャンバー付スライドガラス (Lab-Tek II chamber Slide size 4 well : ナルジェヌンク社製) の各ウェルに  $1 \times 10^5$  細胞の割合で植え込み、10% FBS含有DMEMで5% CO<sub>2</sub> 雰囲気下、37℃で24時間、培養した。培地を除去後、実施例6で調製したFITC標識オリゴヌクレオチド濃度300 nM、実施例1で調製した配列番号1のペプチド2.5  $\mu$ Mを含有するopti-MEMを添加し4時間培養した。10% FBS含有DMEMに置換して5% CO<sub>2</sub> 雰囲気下、37℃でさらに24時間、培養した後、細胞をPBSで洗浄後、4%パラホルムアルデヒド含有PBSで固定し、蛍光顕微鏡 (AH-3 : オリンパス社製) で細胞核にFITC標識オリゴヌクレオチドが集積しているか否かを確認した。その結果、細胞核にFITC標識オリゴヌクレオチドが集積していることを確認した。一方、配列番号1のペプチド非存在下では、細胞内にFITC標識オリゴヌクレオチドは認められなかった。

【0118】

#### <実施例11>ペプチドが有する細胞への核酸導入能の評価 (1)

実施例9に記載の方法にしたがって、配列番号1のペプチドの細胞への核酸導



入能を検証した。図12は、配列番号1のペプチドの有無による、細胞内へ導入されるプラスミド量の差をルシフェラーゼ活性により比較した図である。図に示したように、配列番号1のペプチドは核酸を細胞内へ導入する能力を有することが認められた。一方、配列番号1のペプチド非存在下では核酸は細胞内へ導入されなかった。

【0119】

＜実施例12＞ペプチドが有する細胞への核酸導入能の評価（2）

配列番号1のペプチドを基準として、「本発明の四面構造を示す18アミノ酸配列」中の1箇所若しくは2箇所をアミノ酸置換した配列番号2～18のペプチドの、細胞への核酸導入能を実施例9に記載の方法にしたがって評価した。その結果、いずれのペプチドも細胞への核酸導入能を有していることがわかった。

なお、核酸導入能は、たんぱく質1mgあたり、1秒あたりの蛍光カウント数（cps/mg protein）により以下のように分類し、結果の一覧を表2に示した。

10,000以上	100,000未満	...	1+
100,000以上	1,000,000未満	...	2+
1,000,000以上	10,000,000未満	...	3+
10,000,000以上		...	4+
100,000,000以上	1,000,000,000未満	...	5+
1,000,000,000以上		...	6+

なお、配列番号1は、上記分類では3+に相当する。

【0120】

【表 2】

表 2

配列番号	核酸導入能
配列番号 2	3 +
配列番号 3	2 +
配列番号 4	4 +
配列番号 5	2 +
配列番号 6	2 +
配列番号 7	2 +
配列番号 8	3 +
配列番号 9	3 +
配列番号 10	3 +
配列番号 11	3 +
配列番号 12	2 +
配列番号 13	3 +
配列番号 14	3 +
配列番号 15	2 +
配列番号 16	4 +
配列番号 17	2 +
配列番号 18	4 +
配列番号 19	4 +
配列番号 20	4 +
配列番号 21	2 +
配列番号 22	3 +
配列番号 23	2 +
配列番号 24	1 +

【0121】

### ＜実施例 13＞ペプチドが有する細胞への核酸導入能の評価（3）

配列番号 1 のペプチドを基準として、「本発明の四面構造を示す 18 アミノ酸配列」中の 3 箇所をアミノ酸置換した配列番号 19～22 のペプチドの、細胞への核酸導入能を実施例 9 の記載の方法にしたがって評価した。その結果、このペプチドは細胞への核酸導入能を有していることがわかった。

なお、核酸導入能は、たんぱく質 1 mg あたり、1 秒あたりの蛍光カウント数により実施例 12 に記載の方法にしたがって分類し、結果の一覧を表 2 に示した。

### 【0122】

### ＜実施例 14＞ペプチドが有する細胞への核酸導入能の評価（4）

配列番号 1 及び配列番号 4 のペプチドを基準として、各々の欠失体である配列番号 23、24 のペプチドを作成し、細胞への核酸導入能を実施例 9 の記載の方法にしたがって評価した。その結果、いずれのペプチドも細胞への核酸導入能を有していることがわかった。

なお、核酸導入能は、たんぱく質 1 mg あたり、1 秒あたりの蛍光カウント数により実施例 12 に記載の方法にしたがって分類し、結果の一覧を表 2 に示した。

### 【0123】

### ＜実施例 15＞ペプチドが有する細胞への核酸導入能の評価（5）

実施例 9 の方法にしたがって、配列番号 16 のペプチドの各種株化癌細胞への核酸導入能を検証した。

癌細胞は、ヒト子宮癌細胞 MES-SA/Dx5（ATCC より購入）、ヒト腎由来形質転換細胞 293（ATCC より購入）、ヒト肝癌細胞 SK-HEP-1（ATCC より購入）、ヒト卵巣癌細胞 SK-OV-3（ATCC より購入）、ラット脳腫瘍細胞 F98（ATCC より購入）、マウスメラノーマ細胞 B16/BL6（北海道大学免疫科学研究所化学部門より譲渡）、ヒト子宮癌細胞 MES-SA（ATCC より購入）、マウス肺癌細胞 Lewis Lung Carcinoma（財団法人 癌研究会より譲渡）、マウス肝癌細胞 MH134（財団法人 実験動物中央研究所より譲渡）、ヒト子宮癌細胞 MES-SA/Mx2

(ATCCより購入)、ヒト髄芽腫細胞Daoy(ATCCより購入)、ヒト子宮頸癌細胞HeLa(ATCCより購入)、ヒト乳癌細胞MCF7(ATCCより購入)、ヒト膠芽腫細胞U-87 MG(ATCCより購入)、ヒト乳癌細胞MDA-MB-468(ATCCより購入)、ヒト腎癌細胞A-498(ATCCより購入)、マウスメラノーマ細胞B16/F10(ATCCより購入)、ヒト前立腺癌細胞DU145(ATCCより購入)、ヒト脳腫瘍細胞U-138 MG(ATCCより購入)、マウス肉腫細胞Meth-A(国立がんセンターより譲渡)を用いた。各細胞の培養に用いた増殖培地は、表5中に記載した。なお、添加物NEAA(ICN社製)は非必須アミノ酸であり、Na・Pyr(ICN社製)はピルビン酸ナトリウムを示す。また、FBSは全てニチレイ社製のものを、培地はライフテックオリエンタル社製のものを使用し、全ての増殖培地にペニシリン・ストレプトマイシン(ICN社製)を添加した。

## 【0124】

継代維持した細胞を24ウェル培養プレートに1ウェルあたり $1 \times 10^5$ 細胞の割合で植え込み、各増殖培地で5%CO<sub>2</sub> 雰囲気下、37℃で24時間培養した。培地を除去した後、実施例7で調製したルシフェラーゼ発現プラスミド濃度が1  $\mu$ g/mLになるよう、及び、実施例1で調製したペプチド濃度が2.5  $\mu$ Mとなるように調製したopti-MEMを添加して5時間培養した。続いて、培地を各増殖培地に置換して5%CO<sub>2</sub> 雰囲気下37℃でさらに24時間培養した後、実施例9に記載の方法にしたがって細胞内で発現しているルシフェラーゼ活性を測定し、実施例12に記載の基準にしたがってペプチドの遺伝子導入能を表3に示した。

## 【0125】

【表 3】

表 3

細胞株	組織	増殖培地	核酸導入能
MES-SA/Dx5	ヒト子宮癌	10%FBS含有McCoy's 5A	6+
293	ヒト腎	10%FBS含有DMEM	6+
SK-HEP-1	ヒト肝癌	10%非動化 FBS含有MEM (NEAA, Na, Pyr 添加)	5+
SK-OV-3	ヒト卵巣癌	15%FBS含有RPMI1640	5+
F98	ラット脳腫瘍	10%FBS含有DMEM	5+
B16/BL6	マウスメラノーマ	10%非動化 FBS含有MEM (NEAA, Na, Pyr 添加)	5+
MES-SA	ヒト子宮癌	10%FBS含有McCoy's 5A	5+
Lewis Lung Carcinoma	マウス肺癌	10%FBS含有DMEM	4+
MH-134	マウス肝癌	10%非動化 FBS含有RPMI1640	4+
MES-SA/Mx2	ヒト子宮癌	10%FBS含有 (1:1 Waymouth's MB752/and McCoy's 5A)	4+
Daoy	ヒト髄芽腫	10%FBS含有MEM	4+
HeLa	ヒト子宮頸癌	10%FBS含有DMEM	4+
MCF7	ヒト乳癌	10%非動化 FBS含有RPMI1640	4+
U-87 MG	ヒト膠芽腫	10%非動化 FBS含有MEM (NEAA, Na, Pyr 添加)	4+
MDA-MB-468	ヒト乳癌	10%非動化 FBS含有RPMI1640	4+
A-498	ヒト腎癌	10%FBS含有DMEM	4+
B16/F10	マウスメラノーマ	10%FBS含有DMEM	4+
DU 145	ヒト前立腺癌	10%非動化 FBS含有MEM (NEAA, Na, Pyr 添加)	4+
U-138 MG	ヒト脳腫瘍	10%FBS含有DMEM	4+
Met h-A	マウス肉腫	10%FBS含有DMEM	4+

## 【0126】

## ＜実施例16＞ペプチドが有する細胞への核酸導入能の評価（6）

実施例7で調製したHSV-tk発現プラスミドを実施例1で調製した配列番号16のペプチドを用いてLewis Lung Carcinoma細胞（マウス肺癌細胞）に組み込み、ガンシクロビル（以降GCVと記す）感受性亢進効果を検討した。すなわち、96well培養プレート（ナルジェヌン社製）に細胞を $5 \times 10^3$ 細胞の割合で植え込み、10%FBS含有DMEMで5%CO<sub>2</sub>雰囲気下、37℃で24時間培養した。培地を除去後、HSV-tk発現プラスミド濃度が1 $\mu$ g/mLになるよう、及び配列番号16のペプチド濃度が2.5 $\mu$ Mとなるように調製したopti-MEMを100 $\mu$ Lずつウェルに添加して5時間培養した。続いてGCV（デノシン：田辺製薬株式会社製）を0、2、20、200 $\mu$ M含有した20%FBS含有DMEMを100 $\mu$ Lずつウェルに添加して5%CO<sub>2</sub>雰囲気下、37℃で3日間培養した。細胞の増殖抑制効果はWST-1アッセイで測定した。すなわち、WST-1溶液（宝酒造社製）を10 $\mu$ Lずつ各ウェルに添加し、1時間反応後、マルチラベルカウンターを用いて測定波長620nm、リファレンス波長450nmで吸光度を測定した。その結果、図13に示すようにHSV-tk発現プラスミドが細胞内へ導入されたLewis Lung Carcinoma細胞はGCVの用量に依存して細胞増殖が抑制されたのに対し、対照としてルシフェラーゼ発現プラスミドが細胞内へ導入された細胞はGCV感受性亢進効果が認められなかった。

## 【0127】

## ＜実施例17＞核酸との複合体の保存安定性の評価

プラスミドとペプチドの複合体の保存安定性を評価した。

実施例7で調製したルシフェラーゼ発現プラスミド濃度が2 $\mu$ g/mLになるよう、及び、実施例1で調製した配列番号4のペプチド濃度が5 $\mu$ Mとなるように調製したopti-MEMにおいて、遺伝子導入時直前に調製したものと1週間（7日）前に調製して4℃で保存したものを各々用いて、実施例9に記載の方法にしたがってVer o細胞にルシフェラーゼ発現プラスミドを導入しルシフェラーゼ活性を測定した。

図 1 4 は、遺伝子導入直前に調製したペプチド／プラスミド複合体の遺伝子導入活性を 1 0 0 % とし、4℃で一週間保存したペプチド／プラスミド複合体の遺伝子導入活性の相対値を示したものである。図 1 4 に示したとおり、4℃で一週間保存したペプチド／プラスミド複合体の遺伝子導入活性は遺伝子導入直前に調製した該複合体の遺伝子導入活性とほぼ同等であった。

## 【 0 1 2 8 】

なお参考までに、市販のプラスミド導入剤であるリポフェクチンあるいはリポフェクトアミン 2 0 0 0 (LipofectAMINE 2 0 0 0 : ライフテックオリエンタル社製) を添付のプロトコールにしたがってルシフェラーゼ発現プラスミドと混合し、同様に、4℃で一週間保存した後の遺伝子導入活性を評価した結果、いずれも著しい活性の低下が認められた。図 1 4 に結果を示す。

## 【 0 1 2 9 】

## ＜実施例 1 8＞ヌクレアーゼ耐性付与能の評価 (1)

天然型 (P=O 体) オリゴヌクレオチドへのヌクレアーゼ耐性付与能を評価した。すなわち、実施例 1 で調製した配列番号 1 のペプチドを 5 0  $\mu$  M、実施例 6 で調製した P=O 体オリゴヌクレオチドを 3  $\mu$  M、及び 1 5 0 m M NaCl、1 2 m M MgCl<sub>2</sub>、1 2 m M CaCl<sub>2</sub> をそれぞれ含む 2 0 m M トリス塩酸緩衝液 (pH=8) にヌクレアーゼ B a 1 3 1 (宝酒造社製) 2 U を加えて 3 0℃、6 0 分反応させた。続いて、フェノール／クロロホルムで未分解オリゴヌクレオチドを抽出した後、実施例 8 に記載の方法にしたがって電気泳動を行い、オリゴヌクレオチドを染色した。

## 【 0 1 3 0 】

図 1 5 に電気泳動図を示す。図から明らかなように、配列番号 1 のペプチドは、天然型 (P=O 体) オリゴヌクレオチドへのヌクレアーゼ耐性付与能があることが示された。

なお参考までに、市販のプラスミド導入剤であるリポフェクチンあるいはリポフェクトアミン 2 0 0 0 を用いて同様にヌクレアーゼ耐性付与能を評価したところ、いずれもオリゴヌクレオチドの泳動染色像は得られず、オリゴヌクレオチドが分解されていることが示された。図 1 5 に結果を示す。

## 【0131】

## ＜実施例19＞ヌクレアーゼ耐性付与能の評価（2）

150 mM NaCl、1.7 mM MgCl<sub>2</sub> を含む20 mM トリスー塩酸緩衝液（pH=8）中で、実施例7に記載の方法で調製したpBR322（終濃度20 μg/mL）と、実施例1で調製した配列番号16のペプチドを電荷比（+/-比）が0～10となるよう混合し、DNase I（宝酒造社製）5 Uを加えて30℃、60分反応させた。続いて、フェノール／クロロホルムで未分解のプラスミドを抽出した後、実施例8に記載の方法にしたがって電気泳動を行い、プラスミドを染色した。

図16に電気泳動図を示す。図から明らかなように、配列番号16のペプチドは、プラスミドへのヌクレアーゼ耐性付与能があることが示された。

## 【0132】

## ＜実施例20＞ペプチドのホスファチジルセリン親和性の評価（EIA）

ペプチドのホスファチジルセリンとの特異的な親和性は、血清アルブミン存在下でホスファチジルセリンには結合するがホスファチジルコリンには結合しないことが知られているヒトFactor VII Iを用いてヒトFactor VII Iのホスファチジルセリン結合に対する阻害活性で測定した。すなわち、ホスファチジルセリン（SIGMA社製）：ホスファチジルコリン（SIGMA社製）＝3：7となるよう混和したリン脂質を10 μg/mL含有したエタノール溶液を96ウェルプレート（イムロンI：ダイナテック社製）に各ウェルに100 μLずつ添加して、濃縮遠心機（EC-95C、佐久間製作所製）を用いて40℃で40分間乾固した。1%ウシ血清アルブミン（BSA, Fraction V以降BSAと記す：生化学工業製）含有TBS（10 mM トリスー塩酸（pH 7.4）、0.9%（W/V）NaCl）溶液を200 μLずつを各ウェルに添加して37℃で2.5時間静置し、ブロッキングしたのち、プレートを水洗し、終濃度1 μg/mLのヒトFactor VII I（アメリカンダイアグノスティカ社製）と各用量の実施例1で調製したペプチドを混和した5% BSA含有TBS溶液を100 μLずつ各ウェルに添加して4℃で24時間反応させた。

## 【0133】



反応終了後は、成書（「酵素免疫測定法（第三版）」、石川栄治ら著、医学書院、1987）に記載の一般的方法に従って、Enzyme Immuno Assay（EIA）によりホスファチジルセリンに結合したヒトFactor V IIIを測定した。すなわち、1次抗体として抗ヒトFactor V IIIマウスモノクローナル抗体（ESH8：アメリカンダイアグノスティカ社製）、2次抗体として西洋わさびパーオキシダーゼ標識抗マウスIgG抗体（P0260、ダコ社製）を用い、テトラメチルベンジジンを発色基質としてその吸光度を測定波長450nm、リファレンス波長630nmで分光光度計（NJ-2100型、インターメッド社製）により測定した。

ペプチドのホスファチジルセリンとの親和性の強度は、ヒトFactor V IIIのみ添加したウェルの吸光度からヒトFactor V IIIを添加しなかったウェルの吸光度を引いた値をコントロール値（100%）とし、ヒトFactor V IIIとペプチドを混和して添加したウェルの吸光度から各種ペプチドのみを添加したウェルの吸光度を引いた値をコントロール値で除した時に0.5となるペプチド濃度をIC<sub>50</sub>値と定め、IC<sub>50</sub>値が1μM以下の場合を++、1μMより大きく10μM以下の場合を+、と定めて評価した。なお、10μM以上の場合の特異的な親和性はないと判定した。結果を表4に示す。

【0134】

【表 4】

表 4

配列番号	ホスファチジルセリン親和性
配列番号 1	++
配列番号 2	++
配列番号 3	++
配列番号 5	++
配列番号 6	++
配列番号 7	+
配列番号 8	+
配列番号 10	+
配列番号 11	+
配列番号 15	++
配列番号 16	++
配列番号 17	++
配列番号 19	++
配列番号 23	++

【0135】

<実施例 21> ペプチドのホスファチジルセリン親和性の評価 (2)

ペプチドのホスファチジルセリン特異的親和性を、表面プラズモン共鳴 (Surface Plasmon Resonance = SPR) によりピアコア 200

0 (ピアコア社製) を用いて測定した。すなわち、H P A c h i p (ピアコア社製) のフローセル1にホスファチジルコリンを、フローセル2にホスファチジルセリン50%/ホスファチジルコリン50%を固相化し、0.1mg/mL B S A 存在下でペプチドの各脂質に対する結合能を測定し親和性を評価した。その結果、配列番号1のペプチドはホスファチジルセリンを固相化したフローセル1と比較して、ホスファチジルセリン50%/ホスファチジルコリン50%を固相化したフローセル2において強く結合し、ホスファチジルセリンに特異的な親和性を示した(図17)。それに対して、配列番号1の配列をランダムに入れ替えた配列番号25のペプチドはホスファチジルコリンを固相化したフローセル1にも、ホスファチジルセリン50%/ホスファチジルコリン50%を固相化したフローセル2においても結合せず、親和性を示さなかった(図18)。

【0136】

#### <実施例22>ホスファチジルセリン表出量と導入効率との相関(選択性)

ペプチドの遺伝子導入能の強さとホスファチジルセリン親和性との相関を明らかにするために、ホスファチジルセリンの細胞表層への表出量が異なる細胞を用いて検討を行った。すなわち、V e r o、A 5 4 9、T 2 4 の各細胞を用いて実施例9の記載にしたがって実施例1で調製した配列番号1のペプチドを用いて実施例7で調製したルシフェラーゼ発現プラスミドを導入し、ルシフェラーゼ活性を測定した。一方、各種細胞の細胞膜外に表出しているホスファチジルセリン量はF I T C 標識したアネキシンV (A N N E X I N V - F I T C : ファーミンジェン社製) を用いて添付の説明書に従って細胞を標識し、フローサイトメトリー (F A C S C a l i b u r : ベクトン・ディッキンソン社製) で測定した。すなわち、培養フラスコで培養した各種培養細胞を剥離し、F I T C 標識アネキシンV 溶液と混和後、フローサイトメトリーで細胞のF I T C 蛍光強度を測定し、各細胞の平均蛍光強度を細胞株のホスファチジルセリン表出量とした。

その結果、表5に示した通り、ホスファチジルセリン表出量(アネキシンV 結合量) とペプチドベクターの遺伝子導入活性とが相関した。

なお、参考までに、市販のプラスミド導入剤であるリポフェクチン (L i p o f e c t i n : ライフテックオリエンタル社製) を添付のプロトコールにしたが

って用いたところ、いずれの細胞にも同等にプラスミドが導入され、ホスファチジルセリンを特異的には認識しないことが示された。

【0137】

【表5】

表5

		ルシフェラーゼ活性 (cps/mg蛋白)	
細胞名	Annexin-V 結合量	ペプチド (配列番号1)	リポフェクチン
Vero	165	$2.5 \times 10^6$	$1.1 \times 10^6$
A549	82	$8.7 \times 10^4$	$8.4 \times 10^5$
T24	32	$7.8 \times 10^3$	$1.1 \times 10^6$

【0138】

<実施例23>ホスファチジルセリン表出量と導入効率との相関(2)

ペプチドの遺伝子導入能の強さとホスファチジルセリン親和性との相関を明らかにするために、ホスファチジルセリンを表出していない状態の細胞と、該細胞を刺激してホスファチジルセリンを表出した細胞とを用いてペプチドの核酸導入能の検討を行った。細胞は、RBL-2H3ラット好塩基球由来培養細胞(ATCCより購入)を使用し、抗DNPマウスモノクローナルIgE抗体(SIGMA社製)で感作し、DNP-BSA(Calbiochem社製)で脱顆粒反応を惹起し、この細胞に配列番号16のペプチドを用いて実施例9に記載の方法に準じてルシフェラーゼ遺伝子を導入し、ルシフェラーゼ活性を測定した。すなわ

ち、24ウェルプレートにRBL-2H3細胞を $3 \times 10^5$ 細胞の割合で植え込み、更に100 ng/mLの濃度になるように抗DNPマウスモノクローナルIgE抗体を添加し、24時間培養した。そして各ウェルをPBSで2回洗浄後、DNP-BSAを10 ng/mLになるように添加し、脱顆粒反応を45分間惹起した。更に培地を除去後、生理食塩水で各ウェルを洗浄し、実施例7で調製したルシフェラーゼ発現プラスミド濃度が1  $\mu$ g/mLになるよう、及び、実施例1で調製した配列番号16のペプチド濃度が2.5  $\mu$ Mとなるように調製したopti-MEMを添加して5時間培養した。

## 【0139】

続いて培地を15%非働化FBS含有MEM (NEAA、Na・Pyr添加) に交換し、5%CO<sub>2</sub> 雰囲気下、37℃で1日間培養した。その後、細胞を剥離し、実施例9に記載の方法でルシフェラーゼ活性を測定した。一方、RBL-2H3細胞の脱顆粒反応によるホスファチジルセリン表出量は、以下に記載の方法で測定した。すなわち、6ウェル培養プレート (ナルジェヌンク社製) にRBL-2H3細胞を $1.5 \times 10^6$ 細胞の割合で植え込み、更に100 ng/mLの濃度になるように抗DNPマウスモノクローナルIgE抗体を添加し、15%非働化FBS含有MEM (NEAA、Na・Pyr添加) で5%CO<sub>2</sub> 雰囲気下、37℃で24時間培養した。そして各ウェルをPBSで2回洗浄後、DNP-BSAを10 ng/mLになるように添加し、脱顆粒反応を45分間惹起した。細胞を剥離後、FITC標識アネキシンV (MBL社製) を用いて添付の説明書にしたがって細胞を標識し、フローサイトメトリーで測定した。

その結果、脱顆粒刺激した細胞の表面にはホスファチジルセリンが表出し (図19)、更にペプチドの脱顆粒刺激したRBL-2H3細胞への遺伝子導入能は、脱顆粒反応していない細胞と比較して著しく上昇した (図20)。

なお、市販の遺伝子導入剤リポフェクトアミン2000の遺伝子導入能は、脱顆粒反応した細胞では脱顆粒前と同等か、やや減少した。

## 【0140】

<実施例24>ペプチドが有する細胞への核酸導入能の評価 (7)

*in vivo*でペプチドが遺伝子導入能を示すことを証明するため、Met

h-Aマウス肉腫細胞移植腹水癌モデルを用いてペプチドが有する細胞への核酸導入能の検討を行った。すなわち、Meth-A細胞をBALB/cマウス（日本チャールス・リバーより購入）の腹腔に $4 \times 10^6$ 細胞移植し、4日後に実施例7で調製したルシフェラーゼ発現プラスミド $30 \mu\text{g}$ と実施例1で調製した配列番号16のペプチド $113 \text{ nmol}$ の混和物を腹腔内投与した。更に1日後にマウスを屠殺し、腹腔内のMeth-A細胞を回収して、ルシフェラーゼ活性を測定した。

その結果、図21に示すように対照として生理食塩水のみを投与したマウス及びルシフェラーゼ発現プラスミド $30 \mu\text{g}$ のみを投与したマウスでは全くルシフェラーゼの発現が認められなかったのに対し、ルシフェラーゼ発現プラスミド $30 \mu\text{g}$ と配列番号16のペプチド $113 \text{ nmol}$ の混和物を腹腔内投与したマウスではルシフェラーゼの発現が認められた。

#### 【0141】

#### ＜実施例25＞ペプチドが有する細胞への核酸導入能の評価（8）

*in vivo*でのペプチドの遺伝子導入により薬理効果を示すことを証明するため、HSV-tk遺伝子導入によるGCV感受性の亢進を利用した抗腫瘍効果をLewis Lung Carcinoma細胞（マウス肺癌細胞）腹腔内播種モデルを用いて検討した。すなわち、Lewis Lung Carcinoma細胞をC57BL/6マウス（日本チャールス・リバーより購入）の腹腔内に $1 \times 10^5$ 細胞移植し、実施例7で調製したHSV-tk発現プラスミド $10 \mu\text{g}$ と実施例1で調製した配列番号16のペプチド $40 \text{ nmol}$ の混和物を細胞移植後に腹腔内投与し、更にGCVを $30 \text{ mg/kg/day}$ の用量で移植後1日目から8日目まで投与した。その結果、図22に示すようにマウスの平均生存期間は生理食塩水投与群とGCVを $30 \text{ mg/kg/day}$ の用量で単独投与した群はいずれも14日であったのに対し、HSV-tk発現プラスミド $10 \mu\text{g}$ と配列番号16のペプチド $40 \text{ nmol}$ の混和物を投与後、GCVを $30 \text{ mg/kg/day}$ の用量で投与した群は細胞移植後20日目でも全マウスが生存していた。

#### 【0142】

### ＜実施例 2 6＞ペプチドの毒性の評価

マウスの尾静脈より本発明に用いるペプチドを投与して毒性を評価した。マウスは5週齢、メスのBALB/cを用いて、ペプチドの投与用量は5mg/kgとした。その結果、本発明に用いるペプチド（配列番号16）を投与してもマウスになんら影響が認められなかった。これにより、本発明に用いるペプチドが血液中で凝集塊を形成せず、安全性が高いことがわかる。

【0143】

### ＜実施例 2 7＞プラスミド／ペプチド複合体のPEG修飾

プラスミドとペプチドの複合体の活性化ポリエチレングリコール（PEG）による修飾を行った。

まず、*in vitro*で遺伝子導入に用いるPEG修飾したプラスミド／ペプチド複合体を以下の方法で調製した。

すなわち、あらかじめ、ルシフェラーゼ遺伝子を含むプラスミド（pCMV-Luc）を16μg/mLの濃度で含む生理食塩水100μLと配列番号16のペプチドを48μMの濃度で含む生理食塩水100μLとを室温で混合した。

そこへ、mPEG-SPA5000（succinimidyl ester of methoxy poly(ethylene glycol) propionic acid、Average M. W. 5000、Shearwater社製）を23mg/mLの濃度で含む生理食塩水10μLを添加し、室温で1時間反応させてPEG修飾したpCMV-Luc／ペプチド複合体（PEG1）を得た。

【0144】

次に、*in vivo*で遺伝子導入に用いるPEG修飾したプラスミド／ペプチド複合体を以下の方法で調製した。

すなわち、あらかじめ、前述のプラスミド（pCMV-Luc）を268μg/mLの濃度で含む5%グルコース水溶液1050μLと配列番号16のペプチドを804μMの濃度で含む5%グルコース溶液1050μLとを室温で混合し複合体を形成させた。

そこへ、前述のmPEG-SPA5000を263.8mg/mLの濃度で含

む5%グルコース溶液150 $\mu$ Lを添加し、室温で1時間反応させてPEG修飾したpCMV-Luc/ペプチド複合体(PEG2)を得た。

【0145】

<実施例28>PEG修飾した、プラスミド/ペプチド複合体の遺伝子導入能の評価(in vitro)

実施例27に記載した方法にしたがって調製したpCMV-Luc/ペプチド複合体(PEG1)、若しくは、pCMV-Lucと配列番号16のペプチドの複合体(PEG未修飾物)を、1 $\mu$ g/mLのプラスミド濃度で実施例9に記載した方法にしたがってVer o細胞へ導入し、発現したルシフェラーゼの活性を測定した。

その結果、図23に示すように、PEG修飾した複合体を導入したVer o細胞のルシフェラーゼ活性は、PEG修飾していない複合体を導入したVer o細胞のルシフェラーゼ活性と同等であり、PEG修飾によってもプラスミド/ペプチド複合体の遺伝子導入能が低下しないことが確認された。

【0146】

<実施例29>PEG修飾した、プラスミド/ペプチド複合体の遺伝子導入能の評価(in vivo)

アナフィラキシーショックマウスを用いて、PEG修飾したプラスミド/ペプチド複合体の遺伝子導入能をin vivoで評価した。

はじめに、アナフィラキシーショックマウスを得るために、マウスのovalbumin(以下OVAと記載する)感作を以下の方法で実施した。すなわち、まず、OVA(Egg Albumin, 5 $\times$  Cryst、生化学工業社製)を1.8%塩化ナトリウム水溶液で32 $\mu$ g/mLとなるよう調製した。

次に、水酸化アルミニウムゲル(Alu-Gel-S、SERVA社製)を超純水で8mg/mLとなるよう調製し、この溶液を氷冷し、攪拌しながら前述のOVA溶液を等容混和してOVA/水酸化アルミニウムゲル溶液を調製した。

続いて、このOVA/水酸化アルミニウムゲル溶液をBALB/cマウス(オス、4w、日本チャールス・リバー社)の腹腔に500 $\mu$ L投与してOVA感作を行った。感作は、5日間おいて2回行った。



【0147】

遺伝子導入は、感作開始後13日目に実施した。

すなわち、実施例27に記載した方法にしたがって調製したPEG修飾したpCMV-Luc/ペプチド複合体(PEG2)、若しくは、pCMV-Lucと配列番号16のペプチドの複合体(PEG未修飾物)を、pCMV-Luc換算で50 $\mu$ gの用量で、OVA 50 $\mu$ gと同時に前述のOVA感作マウスに尾静脈から全身投与した。

翌日、右肺を摘出し、Lysis Buffer(プロメガ社製)500 $\mu$ L中で、Handy Pestle(東洋紡社製)を用いて磨砕した。磨砕液を小型遠心分離機(トミー社製)で12000回転で15分間遠心分離し、上静20 $\mu$ Lを実施例9の方法にしたがってルシフェラーゼ活性を測定した。

その結果、図24に示すようにPEG修飾していない複合体を投与したマウスの肺よりも、PEG修飾した複合体を投与したマウスの肺の方が明らかにルシフェラーゼ活性が高かった。

【0148】

<実施例30>PEG修飾した、プラスミド/ペプチド複合体中に存在するPEG修飾ペプチドの同定

実施例27で調製したpCMV-Luc/ペプチド複合体(PEG1)の反応液550 $\mu$ Lを、遠心限外ろ過器Centricon YM-100(アミコン社製)に移し、4℃で1,000xg 10分間の遠心分離を行い、未反応の遊離ペプチド及び遊離PEGを分離・除去した。ろ過器に生理食塩水500 $\mu$ Lを添加し、再度4℃で1,000xg 10分間遠心分離する操作を3回繰り返して洗浄した後、非還元SDSサンプルバッファー(第一化学薬品)50 $\mu$ Lを添加して室温で5分間静置し、限外ろ過膜上に残留したpCMV-Luc/ペプチド複合体(PEG1)を含む試料液(M)を回収した。

次に、この試料液(M)25 $\mu$ Lを5-20%グラジエントゲル(アトー)を用いたSDSポリアクリルアミド電気泳動(20mA定電流、90分間)に供した。電気泳動後のゲルは、銀染色キットII(和光純薬社製)を用いて染色した。

その結果、図 2 5 に示したとおり、分子量 1 0, 0 0 0 D a ~ 2 0, 0 0 0 D a 付近にブロードな染色像が認められ、ペプチド部分の分子量、及び、1 分子あたりの P E G 部分の分子量がそれぞれ約 5, 0 0 0 D a であるから、ペプチド 1 分子あたりの P E G 結合数は 1 ~ 3 分子と推定された。

【 0 1 4 9 】

## &lt; 比較例 1 &gt;

配列番号 1 のペプチドとアミノ酸組成は同じであるが、アミノ酸配列がまったく不規則で「本発明の四面構造を示す 1 8 アミノ酸配列」を含まないペプチド（配列番号 2 5）について、核酸導入能を実施例 9 に記載の方法にしたがって、また、ホスファチジルセリン親和性を実施例 2 0 に記載の方法にしたがって評価した。その結果、核酸導入能、ホスファチジルセリン親和性いずれも認められなかった。

また、実施例 5 に記載の方法にしたがって C D スペクトルを測定した。その結果、S D S 存在下においても  $\alpha$ -ヘリックス構造は認められなかった。

【 0 1 5 0 】

## &lt; 比較例 2 &gt;

配列番号 1 のペプチドにアミノ酸置換を施し、「本発明の四面構造を示す 1 8 アミノ酸配列」を含まないペプチドとなった配列番号 2 6 について、実施例 9 に記載の方法にしたがって核酸導入能を評価した。その結果、蛍光カウント数は 1 0 0 0 0 未満であり、核酸導入能は認められなかった。

【 0 1 5 1 】

## &lt; 比較例 3 &gt;

ポリリジン（平均分子量：1 1 0 0 0）のホスファチジルセリン親和性を実施例 2 0 に記載の方法にしたがって評価した。その結果、ホスファチジルセリン親和性は認められなかった。また、実施例 4 に記載の方法にしたがって B S A 溶液中での吸光度を測定した。その結果、測定値は 1 以上であり、凝集体の形成が認められた。

【 0 1 5 2 】

## &lt; 比較例 4 &gt;

$\alpha$ -ヘリックス構造を有する両親媒性塩基性ペプチドである4<sub>6</sub> (Niidome T et al., J. Biol. Chem., Vol. 272, 15307 (1997)) (配列番号27のペプチド) のホスファチジルセリン親和性を実施例20に記載の方法にしたがって評価した。その結果、ホスファチジルセリン親和性は認められなかった。また、実施例4に記載の方法にしたがってBSA溶液中での吸光度を測定した。その結果、測定値は1以上であり、凝集体の形成が認められた。

【0153】

<比較例5>

比較例4に記載した4<sub>6</sub> (配列番号27のペプチド) を実施例26に記載した方法にしたがってマウスに投与したところ、マウスは投与直後に死亡した。

これは、該ペプチドが $\alpha$ -ヘリックス構造を有する両親媒性塩基性ペプチドであるため血液中で凝集塊を形成し易く、動物体内に投与した場合に著しい毒性を示す結果を反映しているものと考えられた。

【0154】

【発明の効果】

本発明により、安全性が高く、ペプチドと結合する物質との複合体の作製が容易(優れた操作性)であり、複合体の溶解性に優れた、細胞へのペプチドと結合する物質の導入選択性が優れ、導入効率が高いベクターとなる、PEG化学修飾による比活性が低下しない新規PEG化学修飾ペプチド、及び、その製造方法を提供できる。

また、本発明により、PEG化学修飾ペプチドと、ペプチドと結合する物質との複合体、及び、その製造方法を提供できる。

【0155】

具体的な、本発明の効果を以下に述べる。

本発明のペプチドは、核酸と結合能を有し、該核酸を細胞へ導入する能力を有するため、ペプチドベクターとして有用である。

特定の物質の共存下でのみ $\alpha$ -ヘリックス構造を取るため、血清中で実質的な凝集体を形成せず、溶解性が高い。

また、該ペプチドと核酸が結合した場合、該核酸にヌクレアーゼ耐性能を付与するため、安定である。

さらに該ペプチドがホスファチジルセリンに親和性を有する。このため、炎症若しくは免疫担当細胞による細胞の活性化及び／若しくは障害若しくはアポトーシス等のいわゆる免疫応答反応が進展している部位、異常な細胞分裂が進展していわゆる細胞が癌化している部位、血液凝固反応や動脈硬化が進展して血管を構成する細胞が障害されている部位、活性酸素による細胞の障害反応が進展している部位若しくは蛋白質分解酵素による細胞の活性化及び／若しくは障害反応が進展している部位等における細胞、組織及び臓器に核酸を選択的に導入するため、核酸の投与量も少なくてすみ、副作用も軽減する。

【 0 1 5 6 】

本発明のPEG修飾ペプチドは、上記の特徴、効果を保持し、かつ、活性化PEG化学修飾により、例えば、標的細胞への遺伝子の取り込み率の向上、薬理活性の向上、毒性の低減等に優れる。

【 0 1 5 7 】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> Mochida Pharmaceutical Co.,Ltd.

<120> Novel peptide

<130> MD0623

<160> 30

<210> 1

<211> 37

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Peptide

<400> 1

Thr Arg Tyr Leu Arg Ile His Pro Arg Ser Trp Val His Gln Ile Ala Leu

1                      5                      10                      15

Arg Leu Arg Tyr Leu Arg Ile His Pro Arg Ser Trp Val His Gln Ile Ala

20                      25                      30

Leu Arg Ser

35

【 0 1 5 8 】

<210> 2

<211> 37

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220> Description of Artificial Sequence:Peptide

<400> 2

Thr Arg Tyr Leu Arg Ile His Pro Arg Ser Trp Val Arg Gln Ile Ala Leu  
1 5 10 15

Arg Leu Arg Tyr Leu Arg Ile His Pro Arg Ser Trp Val Arg Gln Ile Ala  
20 25 30  
Leu Arg Ser  
35

【 0 1 5 9 】

<210> 3

<211> 37

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Peptide

<400> 3

Thr Arg Tyr Leu Arg Ile His Pro Arg Ser Trp Val His Gln Ile Arg Leu  
1 5 10 15  
Arg Leu Arg Tyr Leu Arg Ile His Pro Arg Ser Trp Val His Gln Ile Arg  
20 25 30  
Leu Arg Ser  
35

【 0 1 6 0 】

<210> 4

<211> 37

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Peptide

<400> 4

Thr Arg Tyr Leu Arg Ile His Pro Arg Ser Trp Leu His Gln Ile Ala Leu  
 1                    5                    10                    15  
 Arg Leu Arg Tyr Leu Arg Ile His Pro Arg Ser Trp Leu His Gln Ile Ala  
                   20                    25                    30  
 Leu Arg Ser  
 35

【 0 1 6 1 】

<210> 5

<211> 37

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Peptide

<400> 5

Thr Arg Phe Leu Arg Ile His Pro Arg Ser Trp Val His Gln Ile Ala Leu  
 1                    5                    10                    15  
 Arg Leu Arg Phe Leu Arg Ile His Pro Arg Ser Trp Val His Gln Ile Ala  
                   20                    25                    30  
 Leu Arg Ser  
 35

【 0 1 6 2 】

<210> 6

<211> 37

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Peptide

<400> 6

Thr Arg Tyr Leu Arg Ile His Pro Arg Ser Trp Val His Asn Ile Ala Leu

1                      5                      10                      15

Arg Leu Arg Tyr Leu Arg Ile His Pro Arg Ser Trp Val His Asn Ile Ala

20                      25                      30

Leu Arg Ser

35

【 0 1 6 3 】

<210> 7

<211> 37

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Peptide

<400> 7

Thr Arg Tyr Leu Arg Ile His Pro Arg Ser Trp Val His Gln Ile Ala Leu

1                      5                      10                      15

Lys Leu Lys Tyr Leu Arg Ile His Pro Arg Ser Trp Val His Gln Ile Ala

20                      25                      30

Leu Arg Ser

35

【 0 1 6 4 】

<210> 8

<211> 37



<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Peptide

<400> 8

Thr Arg Tyr Leu Arg Ile His Pro Lys Ser Trp Val His Gln Ile Ala Leu

1 5 10 15

Arg Leu Arg Tyr Leu Lys Ile His Pro Arg Ser Trp Val His Gln Ile Ala

20 25 30

Leu Arg Ser

35

【0165】

<210> 9

<211> 37

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Peptide

<400> 9

Thr Arg Tyr Leu Arg Ile His Pro Arg Ser Trp Val His Gln Ile Ala Leu

1 5 10 15

Arg Thr Arg Tyr Leu Arg Ile His Pro Arg Ser Trp Val His Gln Ile Ala

20 25 30

Leu Arg Ser

35

【0166】

<210> 10

<211> 37

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Peptide

<400> 10

Thr Arg Ser Leu Arg Ile His Pro Arg Ser Trp Val His Gln Ile Ala Leu

1                      5                      10                      15

Arg Leu Arg Ser Leu Arg Ile His Pro Arg Ser Trp Val His Gln Ile Ala

20                      25                      30

Leu Arg Ser

35

【 0 1 6 7 】

<210> 11

<211> 37

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Peptide

<400> 11

Thr Arg Tyr Leu Arg Ile His Pro Arg Leu Trp Val His Gln Ile Ala Leu

1                      5                      10                      15

Arg Leu Arg Tyr Leu Arg Ile His Pro Arg Leu Trp Val His Gln Ile Ala

20                      25                      30

Leu Arg Ser

35

【 0 1 6 8 】

<210> 12

<211> 37

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Peptide

<400> 12

Thr Arg Tyr Leu Arg Ile His Pro Arg Ser Trp Val His Gln Ile Ala Leu

1 5 10 15

Ser Leu Arg Tyr Leu Arg Ile His Pro Arg Ser Trp Val His Gln Ile Ala

20 25 30

Leu Ser Ser

35

【0169】

<210> 13

<211> 37

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Peptide

<400> 13

Thr Arg Tyr Leu Arg Ile His Pro Arg Ser Leu Val His Gln Ile Ala Leu

1 5 10 15

Arg Leu Arg Tyr Leu Arg Ile His Pro Arg Ser Leu Val His Gln Ile Ala

20 25 30

Leu Arg Ser

35

【0170】

<210> 14

<211> 37

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Peptide

<400> 14

Thr Arg Tyr Leu Arg Ile His Pro Arg Ser Trp Ser His Gln Ile Ala Leu  
 1 5 10 15  
 Arg Leu Arg Tyr Leu Arg Ile His Pro Arg Ser Trp Ser His Gln Ile Ala  
 20 25 30  
 Leu Arg Ser  
 35

【0171】

<210> 15

<211> 37

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Peptide

<400> 15

Thr Arg Tyr Leu Arg Ile Arg Pro Arg Ser Trp Val Arg Gln Ile Ala Leu  
 1 5 10 15  
 Arg Leu Arg Tyr Leu Arg Ile Arg Pro Arg Ser Trp Val Arg Gln Ile Ala  
 20 25 30  
 Leu Arg Ser  
 35

【 0 1 7 2 】

&lt;210&gt; 16

&lt;211&gt; 37

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Description of Artificial Sequence:Peptide

&lt;400&gt; 16

Thr Arg Tyr Leu Arg Leu His Pro Arg Ser Trp Val His Gln Leu Ala Leu

1                    5                    10                    15

Arg Leu Arg Tyr Leu Arg Leu His Pro Arg Ser Trp Val His Gln Leu Ala

20                    25                    30

Leu Arg Ser

35

【 0 1 7 3 】

&lt;210&gt; 17

&lt;211&gt; 37

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Description of Artificial Sequence:Peptide

&lt;400&gt; 17

Thr Arg Ser Leu Arg Ile His Pro Arg Leu Trp Val His Gln Ile Ala Leu

1                    5                    10                    15

Arg Leu Arg Ser Leu Arg Ile His Pro Arg Leu Trp Val His Gln Ile Ala

20                    25                    30

Leu Arg Ser

35

【 0 1 7 4 】

<210> 18

<211> 37

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Peptide

<400> 18

Thr	Arg	Tyr	Leu	Arg	Ile	His	Pro	Arg	Ser	Trp	Leu	His	Gln	Ile	Ala	Leu
1				5					10					15		
Arg	Thr	Arg	Tyr	Leu	Arg	Ile	His	Pro	Arg	Ser	Trp	Leu	His	Gln	Ile	Ala
				20				25				30				
Leu	Arg	Ser														

35

【 0 1 7 5 】

<210> 19

<211> 37

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Peptide

<400> 19

Thr	Arg	Tyr	Leu	Arg	Leu	His	Pro	Arg	Ser	Trp	Leu	His	Gln	Leu	Ala	Leu
1				5					10					15		
Arg	Leu	Arg	Tyr	Leu	Arg	Leu	His	Pro	Arg	Ser	Trp	Leu	His	Gln	Leu	Ala
				20				25				30				

Leu Arg Ser

35

【0176】

<210> 20

<211> 37

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Peptide

<400> 20

Thr Arg Tyr Leu Arg Leu His Pro Arg Ser Trp Val His Gln Leu Ala Leu

1 5 10 15

Arg Thr Arg Tyr Leu Arg Leu His Pro Arg Ser Trp Val His Gln Leu Ala

20 25 30

Leu Arg Ser

35

【0177】

<210> 21

<211> 37

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Peptide

<400> 21

Thr Lys Tyr Leu Lys Ile His Pro Lys Ser Trp Val His Gln Ile Ala Leu

1 5 10 15

Arg Leu Lys Tyr Leu Lys Ile His Pro Lys Ser Trp Val His Gln Ile Ala

20

25

30

Leu Arg Ser

35

【 0 1 7 8 】

<210> 22

<211> 37

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Peptide

<400> 22

Thr Arg Arg Leu Arg Ile His Pro Arg Arg Trp Val His Arg Ile Ala Leu

1

5

10

15

Arg Leu Arg Arg Leu Arg Ile His Pro Arg Arg Trp Val His Arg Ile Ala

20

25

30

Leu Arg Ser

35

【 0 1 7 9 】

<210> 23

<211> 31

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Peptide

<400> 23

Thr Ile His Pro Arg Ser Trp Val His Gln Ile Ala Leu Arg Leu

1

5

10

15



Arg Tyr Leu Arg Ile His Pro Arg Ser Trp Val His Gln Ile Ala Ser

20

25

30

【 0 1 8 0 】

<210> 24

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Peptide

<400> 24

Thr Leu Arg Tyr Leu Arg Ile His Pro Arg Ser Trp Leu His Gln

1

5

10

15

Ile Ala Leu Arg Ser

20

【 0 1 8 1 】

<210> 25

<211> 37

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Peptide

<400> 25

Thr Ile Arg Tyr Arg Pro Ser His Gln Ile Arg Leu Arg Ala Val Leu His

1

5

10

15

Leu Trp Ile Arg Tyr Arg Pro Ser His Gln Ile Arg Leu Arg Ala Val Leu

20

25

30

His Trp Ser

35

【0182】

<210> 26

<211> 37

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Peptide

<400> 26

Thr Arg Tyr Leu Arg Ile His Pro Arg Ser Trp Val Leu Gln Ile Ala Leu

1 5 10 15

Arg Leu Arg Tyr Leu Arg Ile His Pro Arg Ser Trp Val Leu Gln Ile Ala

20 25 30

Leu Arg Ser

35

【0183】

<210> 27

<211> 24

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Peptide

<400> 27

Leu Ala Arg Leu Leu Ala Arg Leu Leu Ala Arg Leu Leu Arg Ala Leu Leu

1 5 10 15

Arg Ala Leu Leu Arg Ala Leu

20

【0184】

<210> 28

<211> 111

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:DNA

<400> 28

actcgttatc ttcgcattca tcctcgaagt tgggttcacc aaatagctct gagactacgg 60  
tacttacgaa ttcacccacg tagctgggtt caccaaatac ctctgcgttc t 111

【0185】

<210> 29

<211> 111

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:DNA

<400> 29

actcgttatc ttcgccttca tcctcgaagt tgggttcacc aactagctct gagactacgg 60  
tacttacgac ttcacccacg tagctgggtt caccaactag ctctgcgttc t 111

【0186】

<210> 30

<211> 111

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

## &lt;223&gt; Description of Artificial Sequence:DNA

&lt;400&gt; 30

actcgttatac ttcgccttca tcctcgaagt tggcttcacc aactagctct gagactacgg 60  
 tacttacgac ttcacccacg tagctggctt caccaactag ctctgcgttc t 111

## 【図面の簡単な説明】

【図1】 図1の(A), (B), (C)は、エドモンソン・ホイール・プロット法による $\alpha$ -ヘリックス構造モデルの概念図である(但し、□で囲んだアミノ酸は疎水性アミノ酸、○で囲んだアミノ酸は塩基性親水性アミノ酸、囲みのないアミノ酸は中性親水性アミノ酸である(以下の図面において同じ))。

【図2】 図2は、本発明に用いるペプチドの18アミノ酸配列の四面構造の一例を示す図である。

【図3】 図3の(A), (B)は、各面への割り振りが異なる本発明に用いるペプチドの四面構造の例を示す図である。

【図4】 図4の(a)は(C1)を表し、(b)は(C2)を表す。(C1)及び(C2)は、各面への割り振りが異なる本発明に用いるペプチドの四面構造の例を示す図である。

【図5】 図5の(A), (B)は、本発明の18アミノ酸配列を含むペプチドの四面構造の例を示す図である。

【図6】 図6の(a)は(C)を表し、(b)は(D)を表す。(C)及び(D)は、本発明の18アミノ酸配列を含むペプチドの四面構造の例を示す図である。

【図7】 図7の(a)は、SDS(-)のCDスペクトル測定による平均残基楕円率曲線を示した図であり、(b)は、SDS(+)のCDスペクトル測定による平均残基楕円率曲線を示した図である。

【図8】 図8の(a)は、SDS(-)のCDスペクトル測定による平均残基楕円率曲線を示した図であり、(b)は、SDS(+)のCDスペクトル測定による平均残基楕円率曲線を示した図である。

【図9】 図9の(a)は、SDS(-)のCDスペクトル測定による平均残

基槽円率曲線を示した図であり、(b)は、SDS(+)のCDスペクトル測定による平均残基槽円率曲線を示した図である。

【図10】 図10は、配列番号1のペプチドとオリゴヌクレオチドの混合物の電気泳動図である。

【図11】 図11は、配列番号1のペプチドとプラスミドの混合物の電気泳動図である。

【図12】 図12は、配列番号1のペプチドの有無による、細胞内へのプラスミドの導入能を、プラスミドが発現するルシフェラーゼ活性を指標として表した図である。

【図13】 図13は、配列番号16のペプチドを用いてHSV-tk遺伝子を含むプラスミドを細胞内に導入するとGCV感受性が亢進することを示した図である。

【図14】 図14は、配列番号1のペプチドが有する細胞内へのプラスミドの導入能を、プラスミドとの複合体を4℃で保存する前後において、プラスミドが発現するルシフェラーゼ活性を指標として表した図である。

【図15】 図15は、配列番号1のペプチドとオリゴヌクレオチドの混合物をヌクレアーゼ処理した後のオリゴヌクレオチドの電気泳動図である。

【図16】 図16は、配列番号16のペプチドとプラスミドの混合物をヌクレアーゼ処理した後のプラスミドの電気泳動図である。コントロールはヌクレアーゼ未処理のプラスミドである。

【図17】 図17は、配列番号1のペプチドとホスファチジルセリンの特異的親和性をピアコア2000を用いて測定した図である。

【図18】 図18は、配列番号25のペプチドがホスファチジルセリンにもホスファチジルコリンにも親和性を示さないことをピアコア2000を用いて測定した図である。

【図19】 図19は、細胞を脱顆粒刺激すると細胞表面にホスファチジルセリンが表出することをフローサイトメトリーを用いて示した図である。

【図20】 図20は、配列番号16のペプチドは、脱顆粒反応が起きて細胞表面にホスファチジルセリンが表出した細胞により多く遺伝子導入することを示

した図である。

【図 2 1】 図 2 1 は、配列番号 1 6 のペプチドが、マウスへ移植した癌細胞内へプラスミドを導入する能力があることを、プラスミドが発現するルシフェラーゼ活性を指標として表した図である。

【図 2 2】 図 2 2 は、配列番号 1 6 のペプチドを用いて HSV-tk 遺伝子を含むプラスミドをマウスに移植した癌細胞内に導入して GCV 投与するとマウスの生存期間が延長することを示した図である。

【図 2 3】 図 2 3 は、Vero 細胞を用いて、PEG 修飾したプラスミド／ペプチド複合体と、同 PEG 未修飾体の遺伝子導入能を比較した図である。

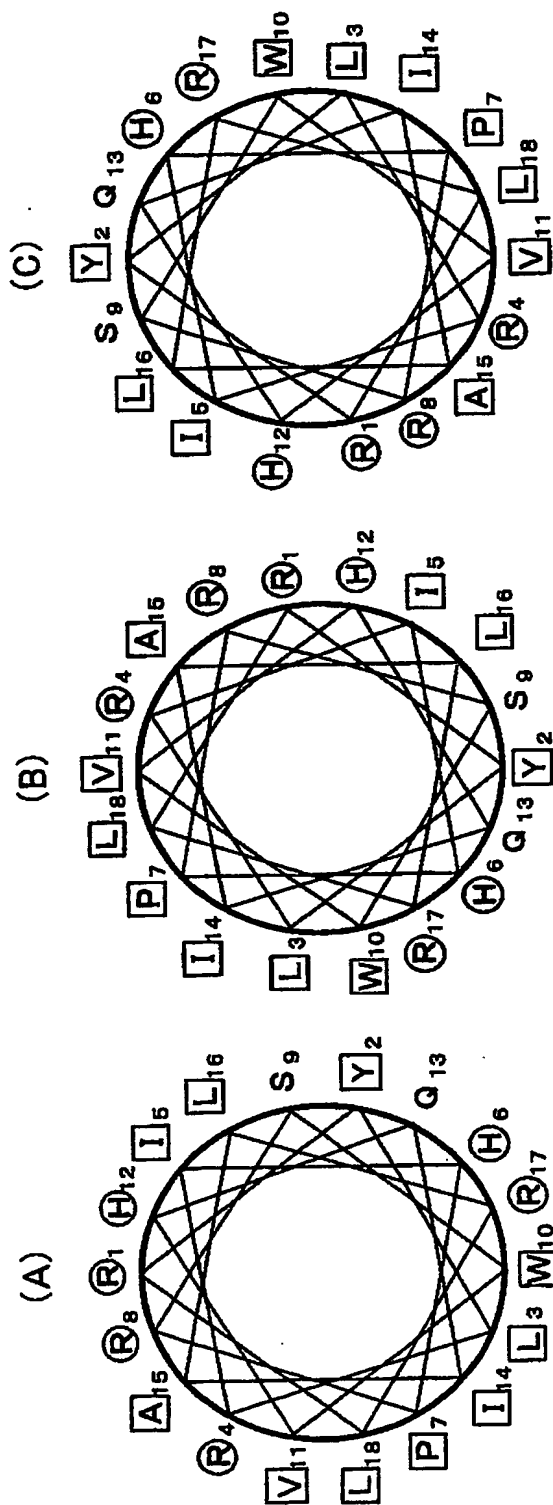
【図 2 4】 図 2 4 は、アナフィラキシーショックマウスを用いて、PEG 修飾したプラスミド／ペプチド複合体と、同 PEG 未修飾体の遺伝子導入能を比較した図である。

【図 2 5】 図 2 5 は、SDS-PAGE によって、PEG 修飾したプラスミド／ペプチド複合体中に存在する PEG 修飾ペプチドを同定した図である。

【書類名】

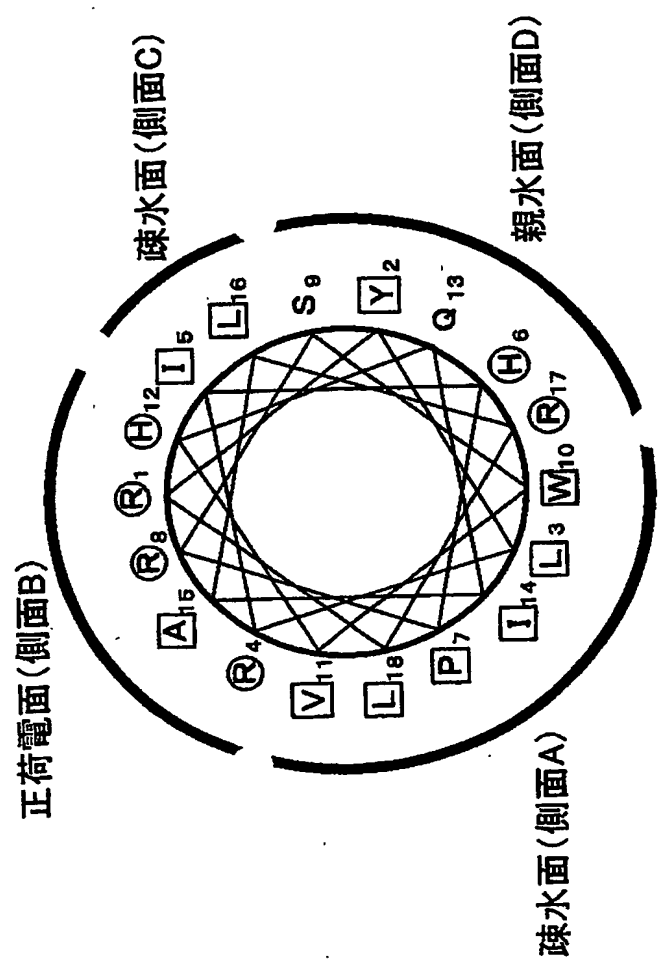
図面

【図 1】



RYLRIHPRSWVHQIALRL

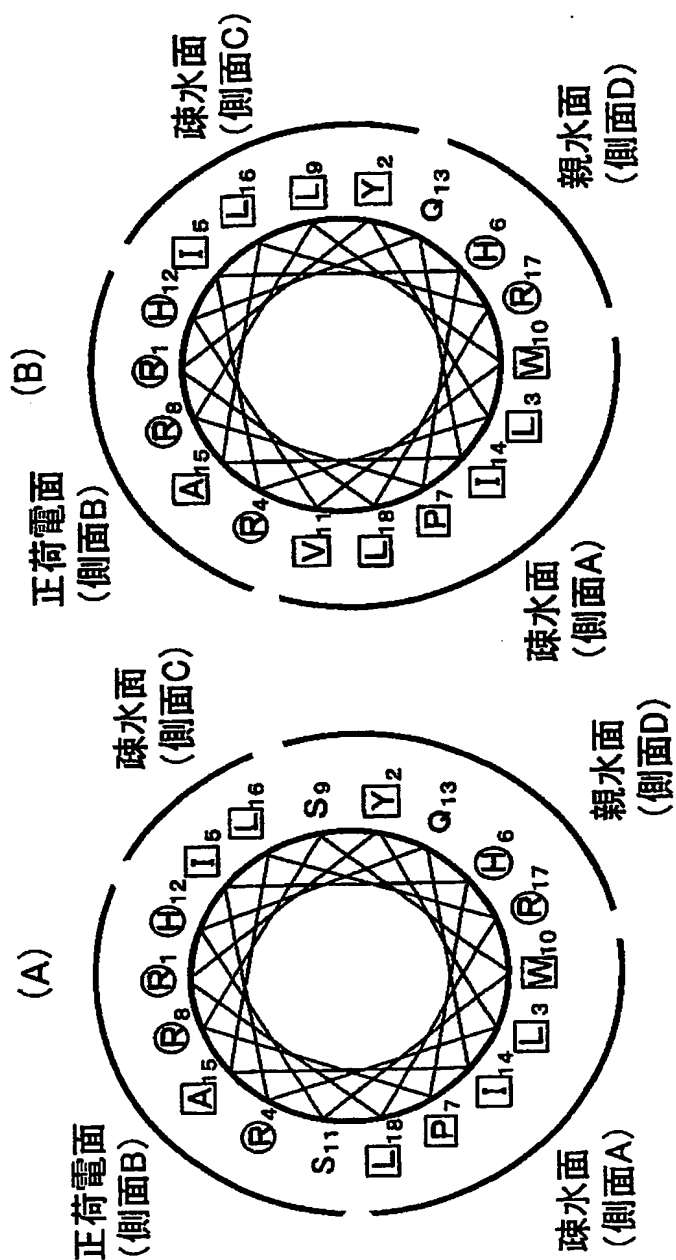
【図2】



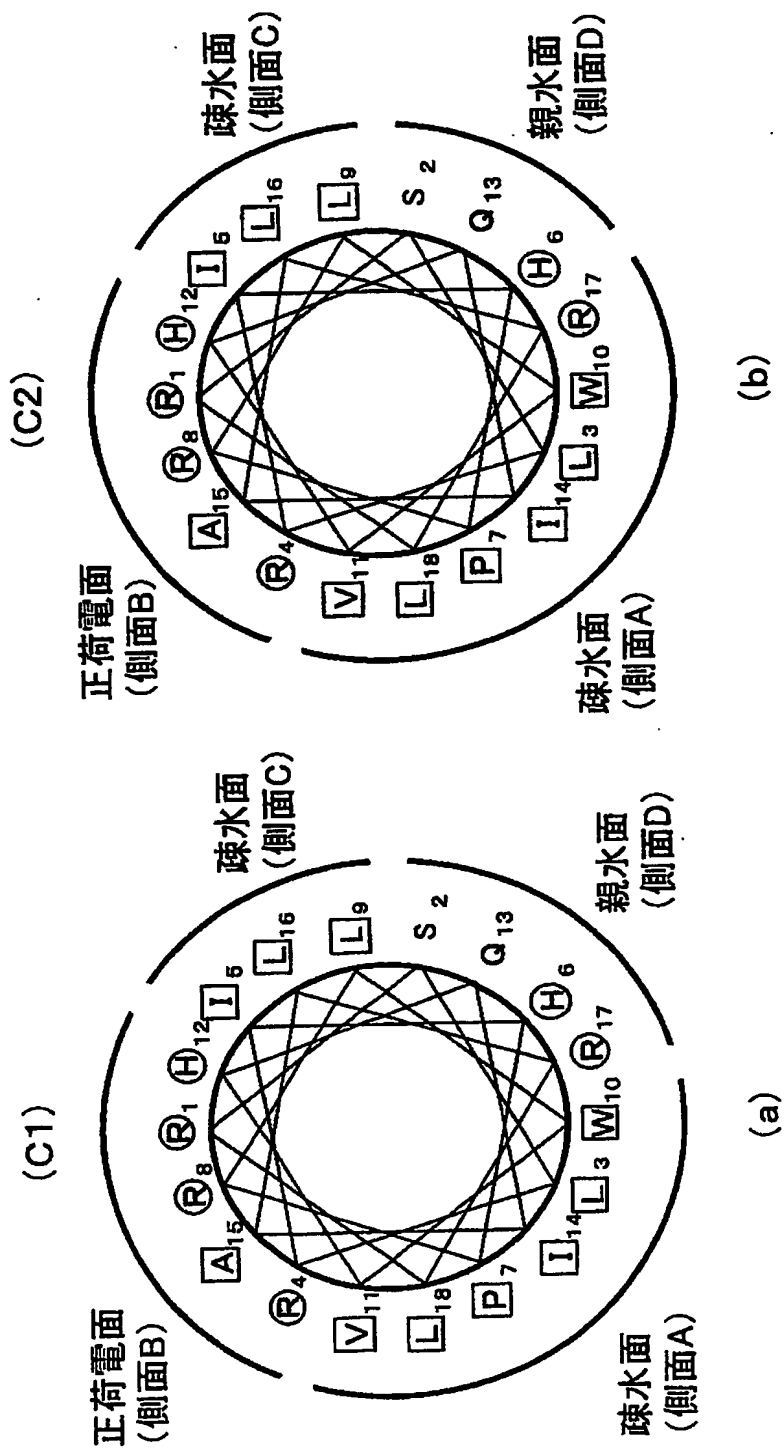
RYLRIHPRSWVHQIALRL



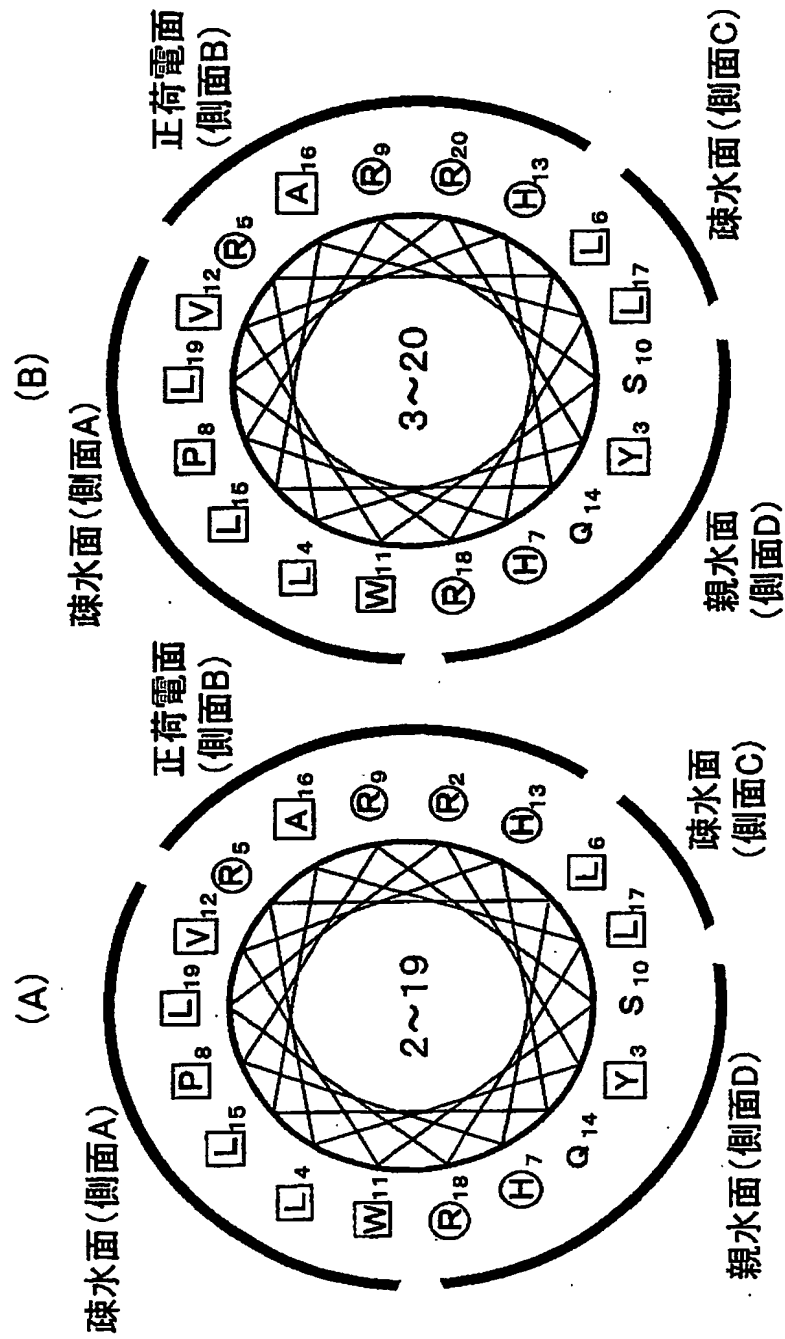
【図 3】



【図 4】

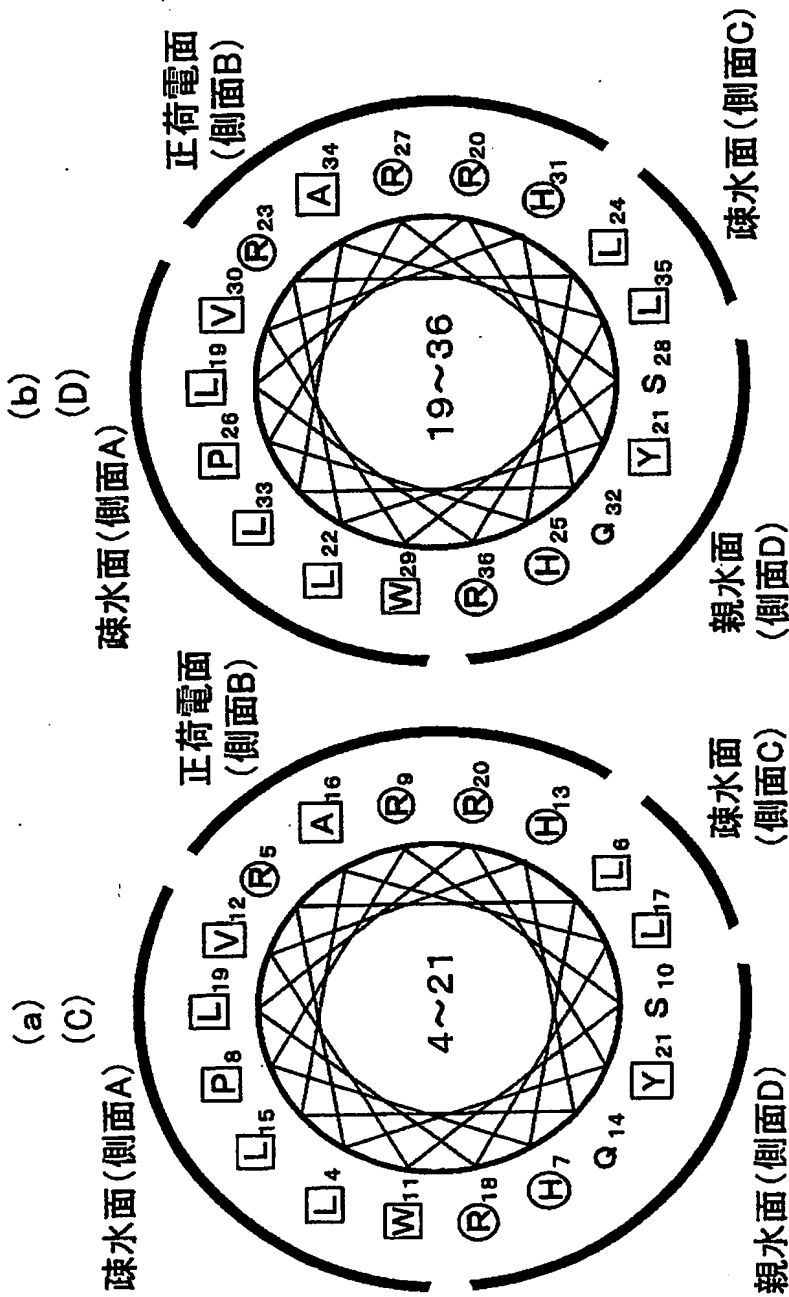


【図5】



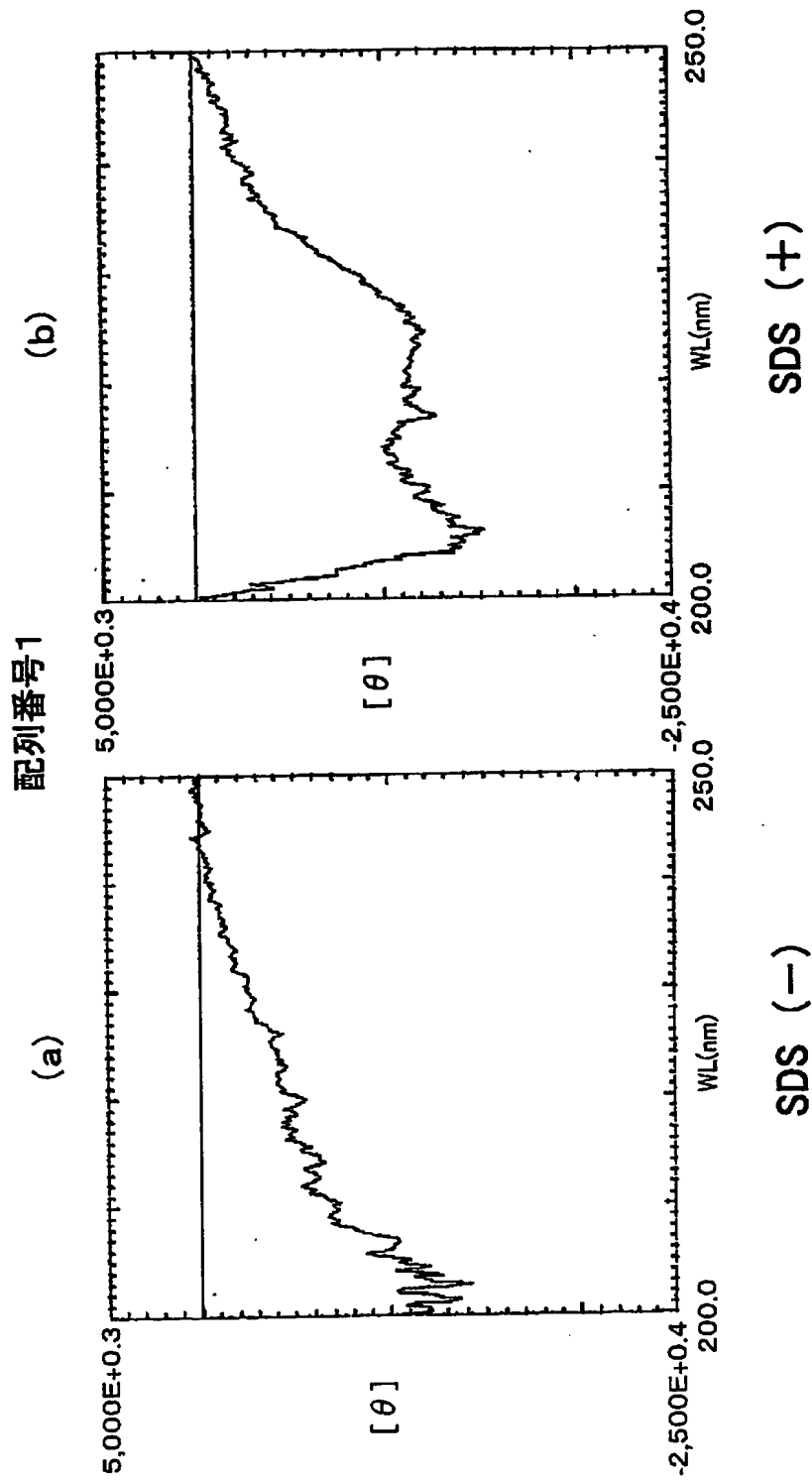
TRYLRHPRSWVHQLALRLRYLRHPRSWVHQLALRS

【図 6】

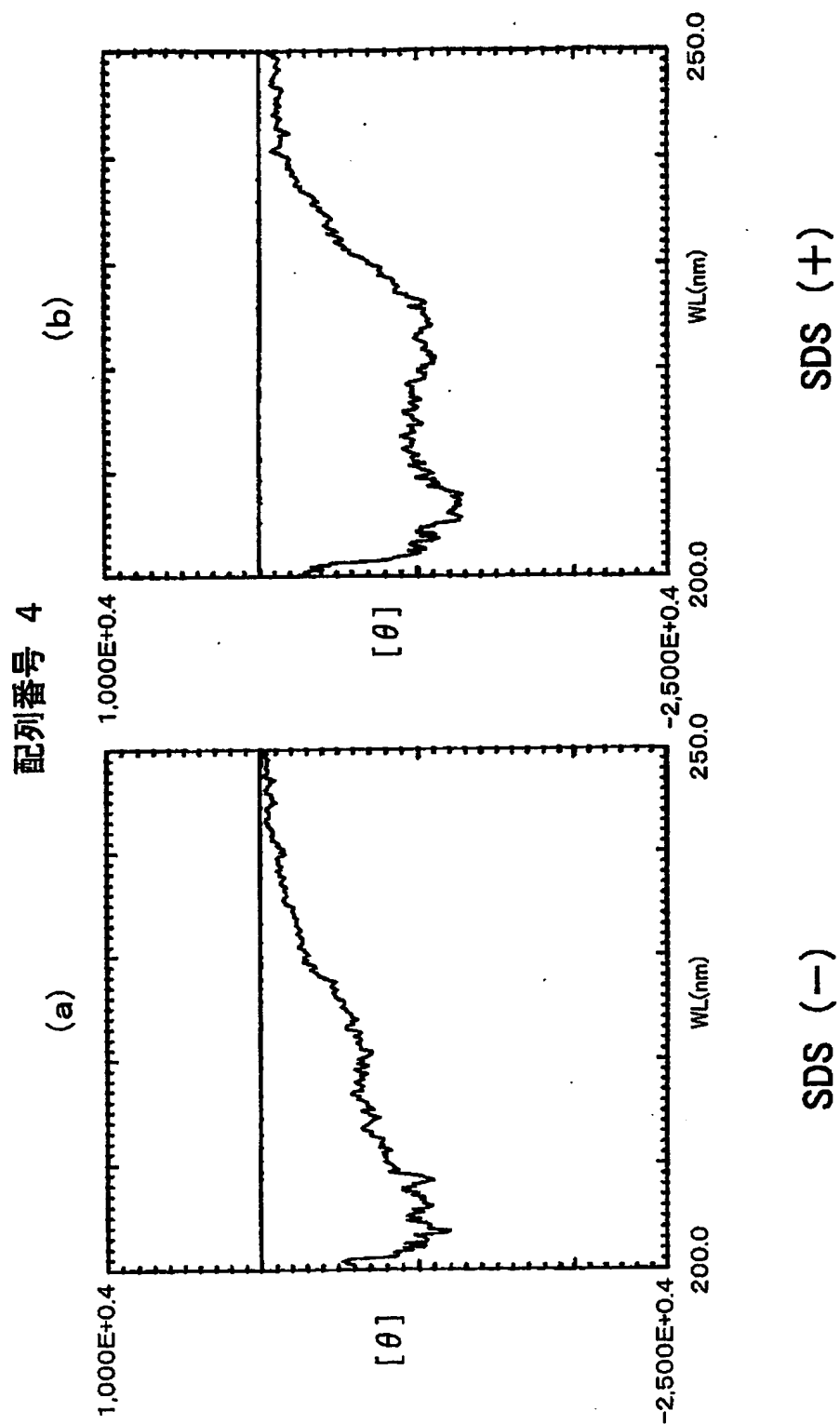


TRYLRHPRSWVHQLALRLRYLRHPRSWVHQLALRS

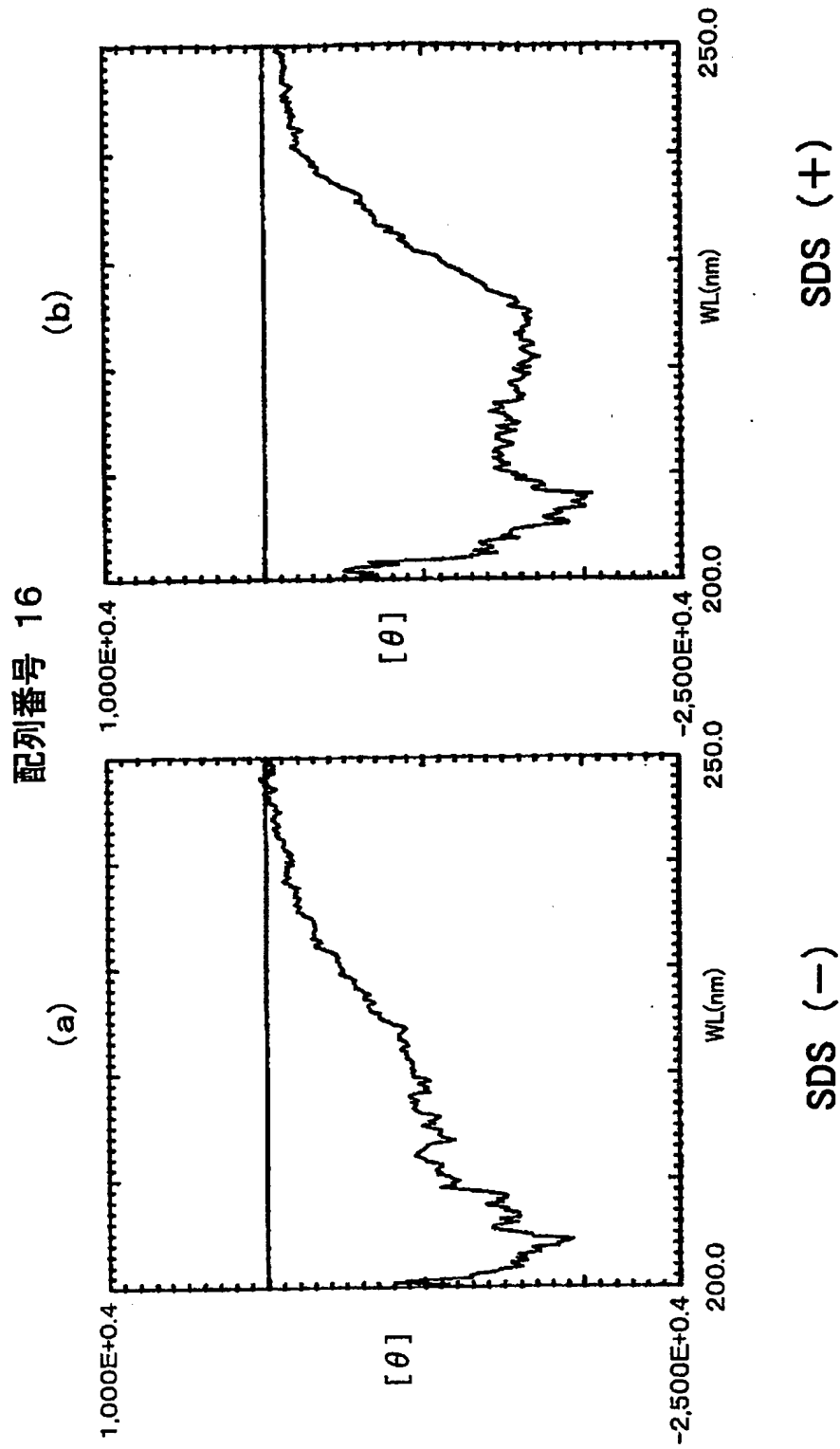
【図 7】



【図 8】

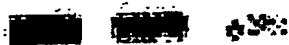


【図 9】



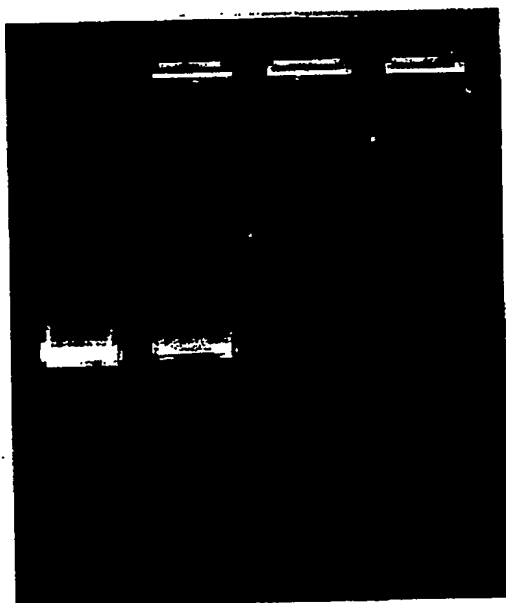
【図 10】

(+)/(-)比  
0 1 3 10



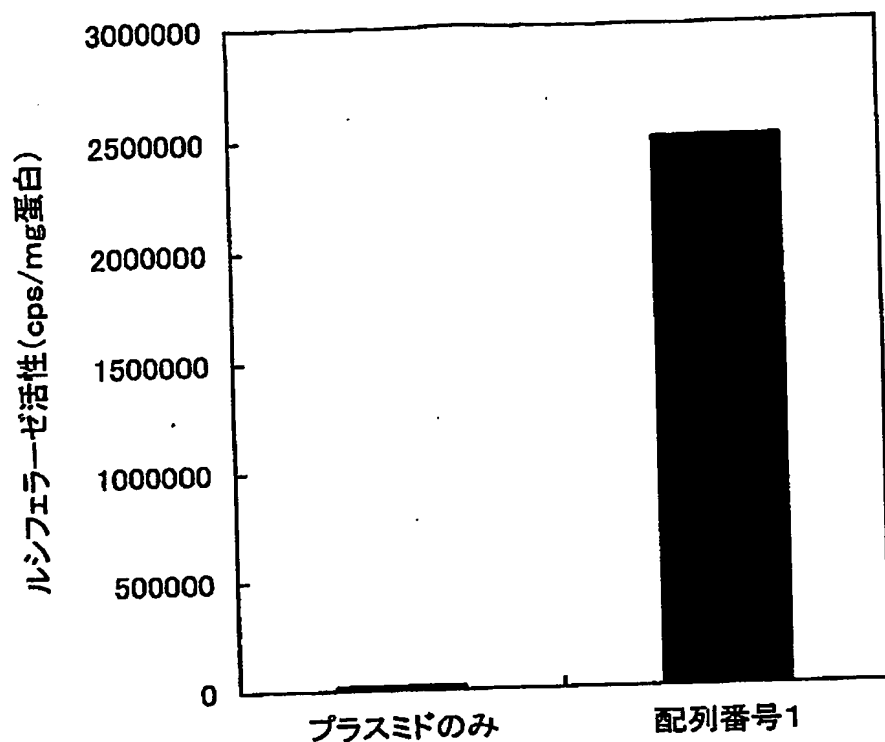
【図 11】

(+)/(-)比  
0 1 2 3

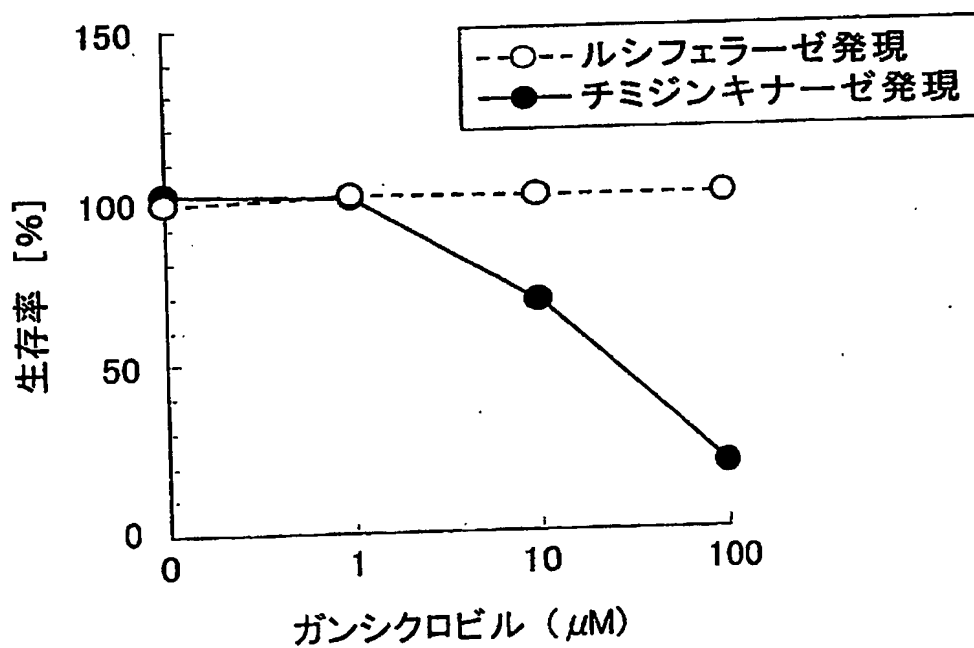




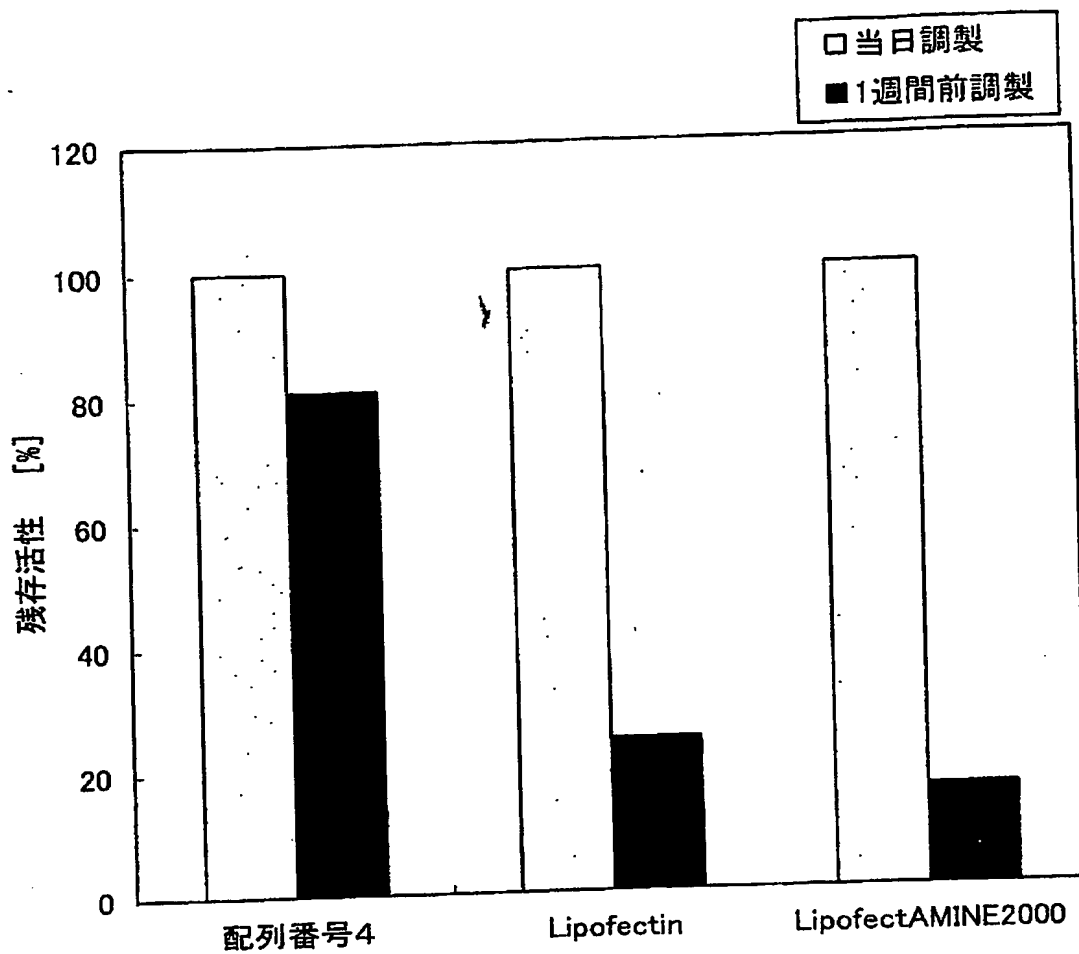
【図12】



【図13】




【図 14】



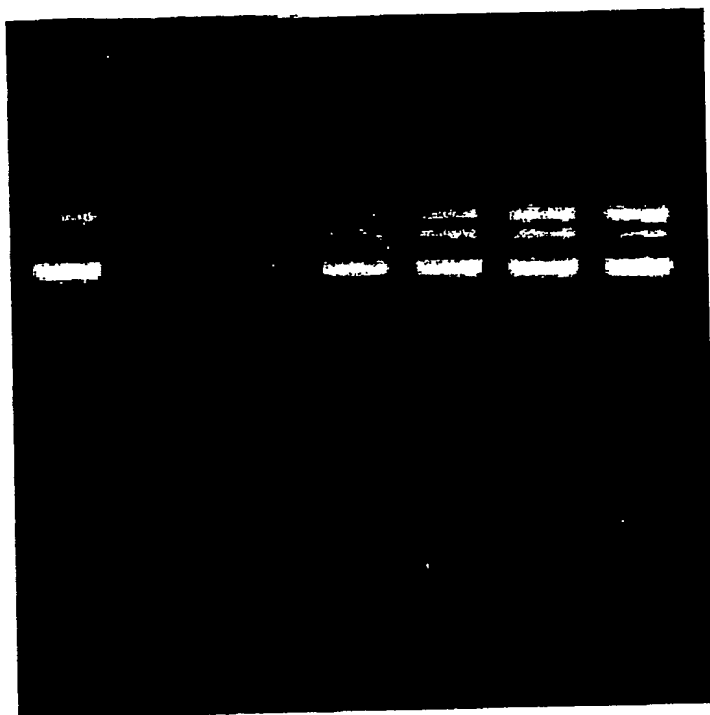
【図15】

	Bal 31(-)					Bal 31(+)				
配列番号1	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-
Lipofectin	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-
LipofectAMINE 2000	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+

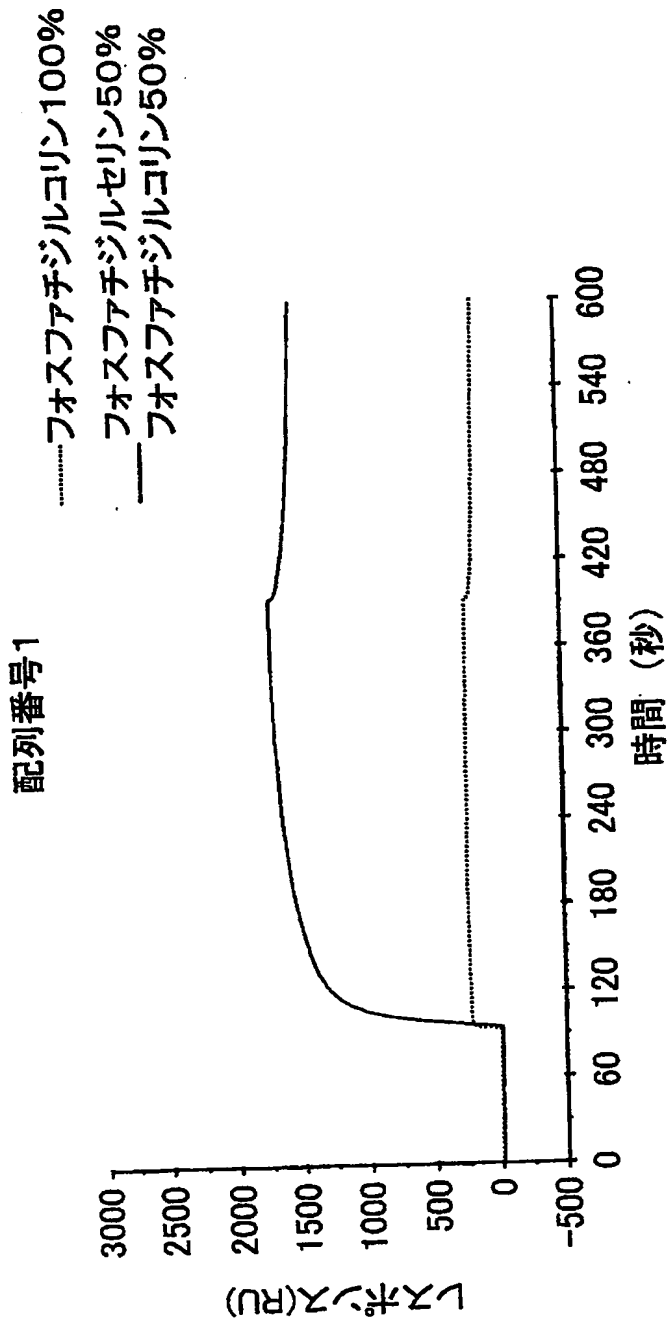


【図16】

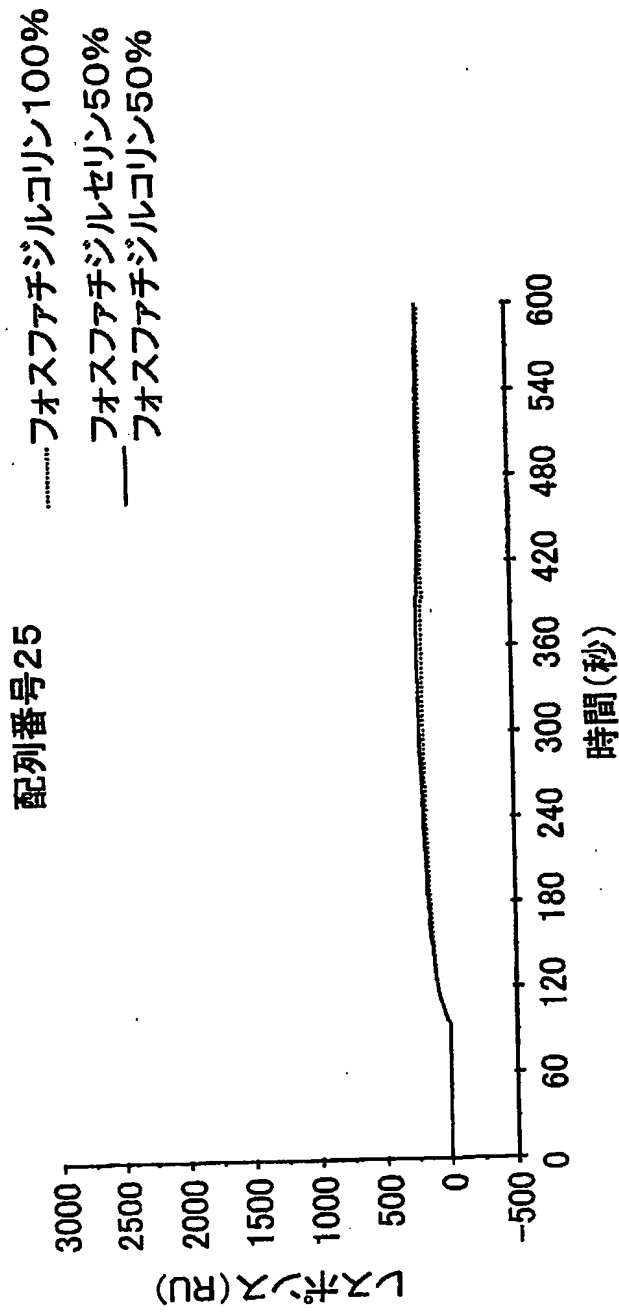
(+) / (-) 比  
コントロール 0 1 2 3 5 10



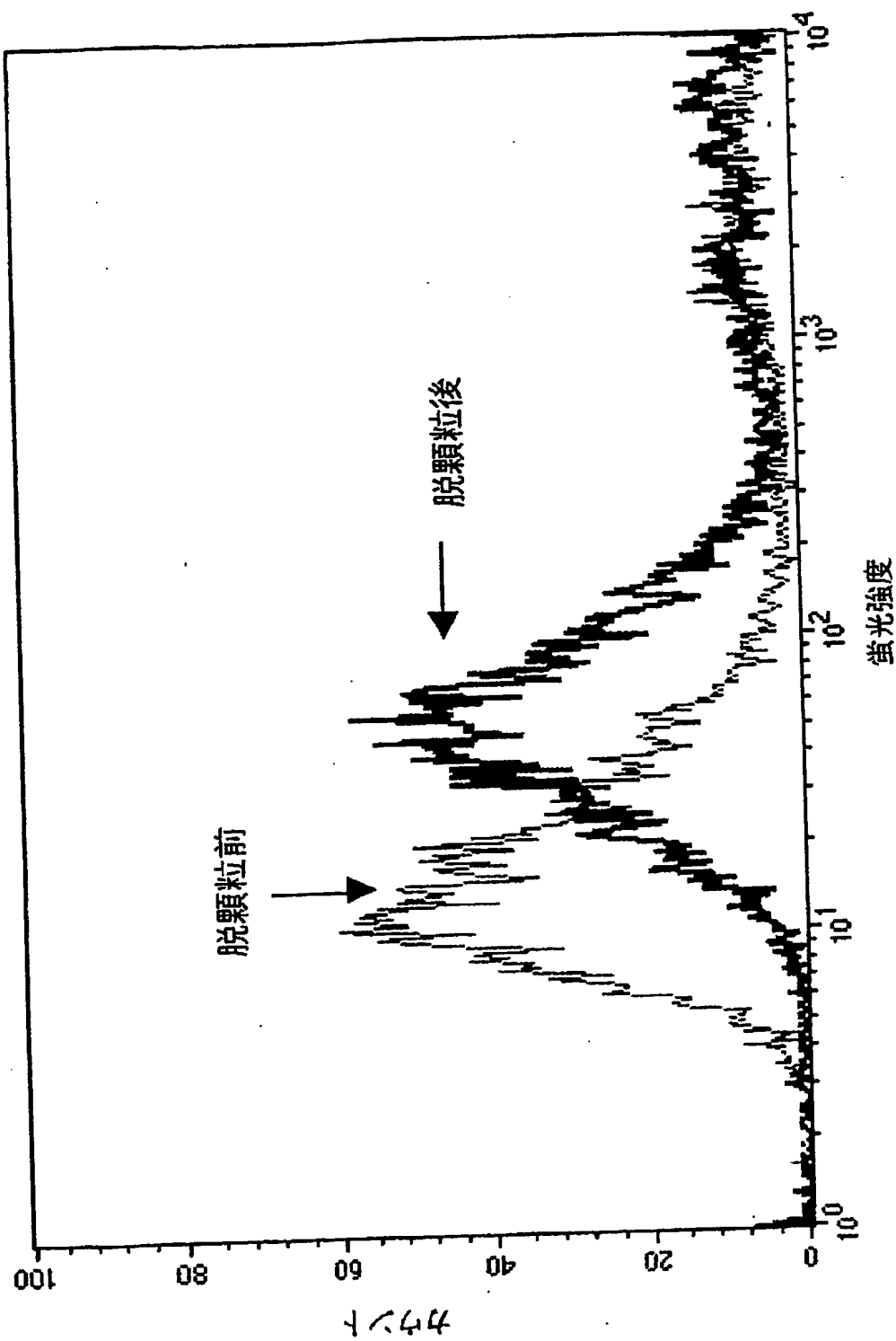
【図17】



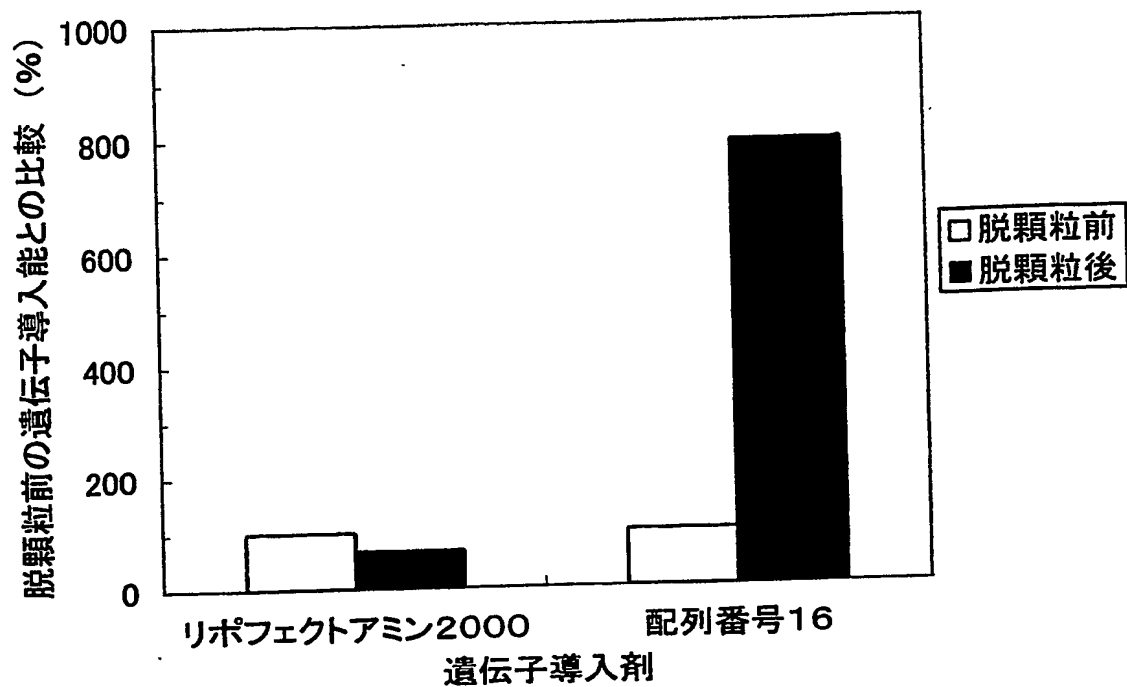
【図 18】



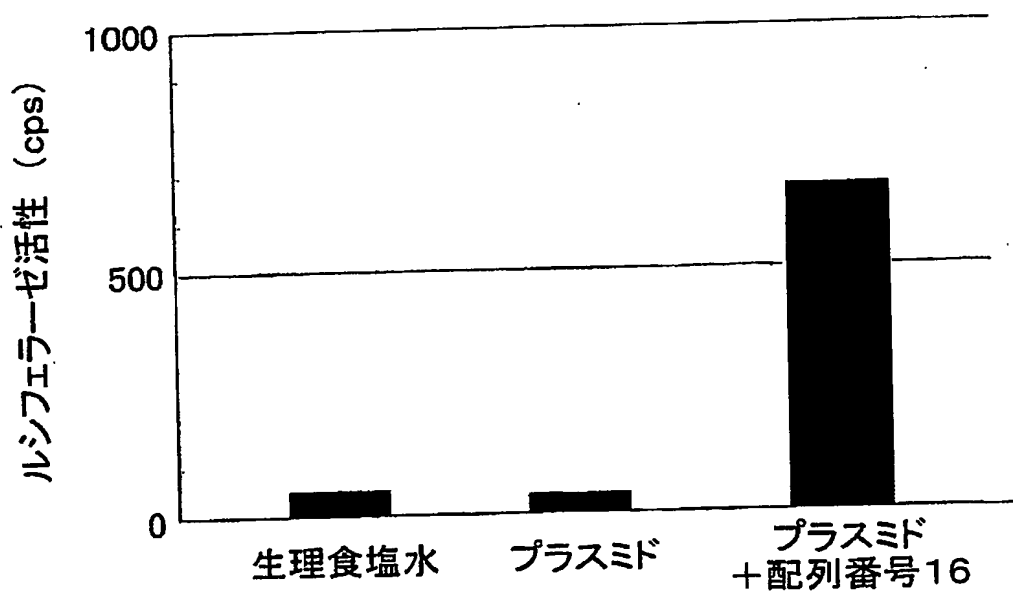
【図19】



【図 20】

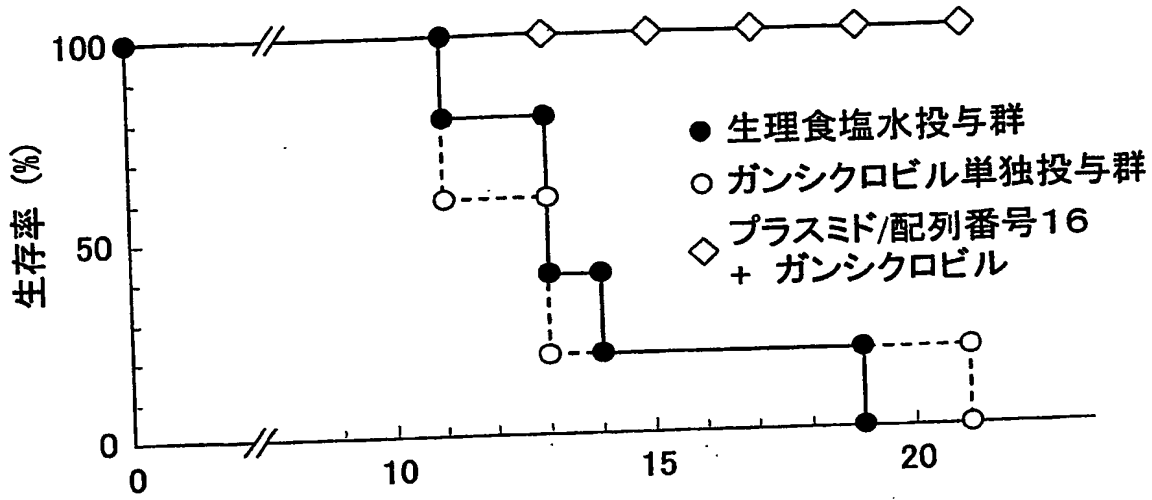


【図 21】

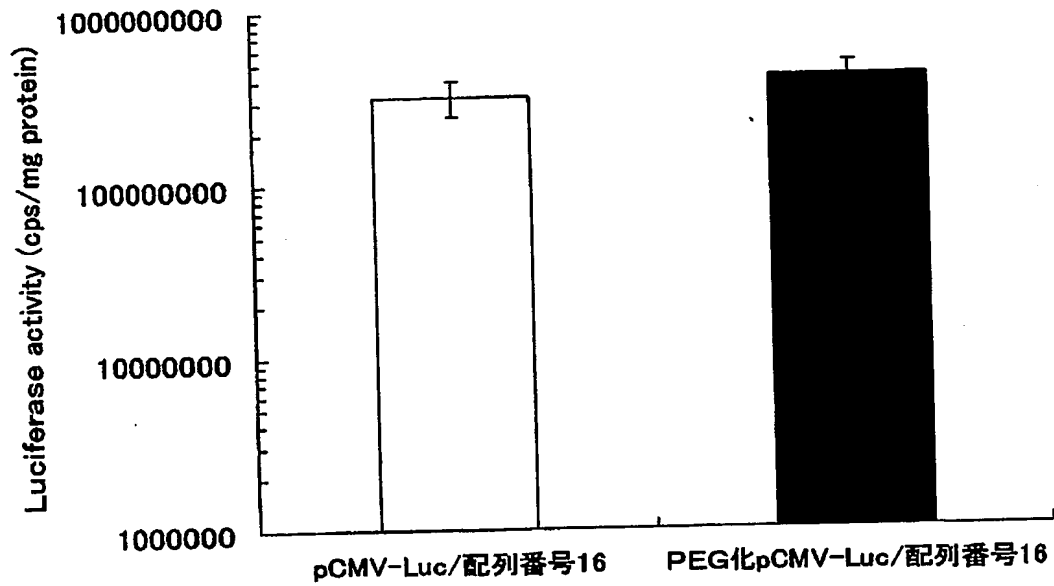




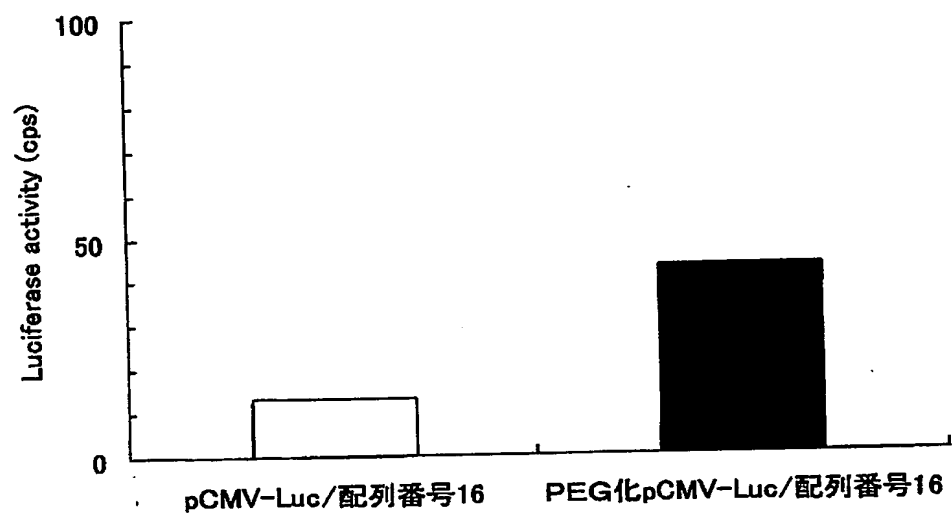
【図22】



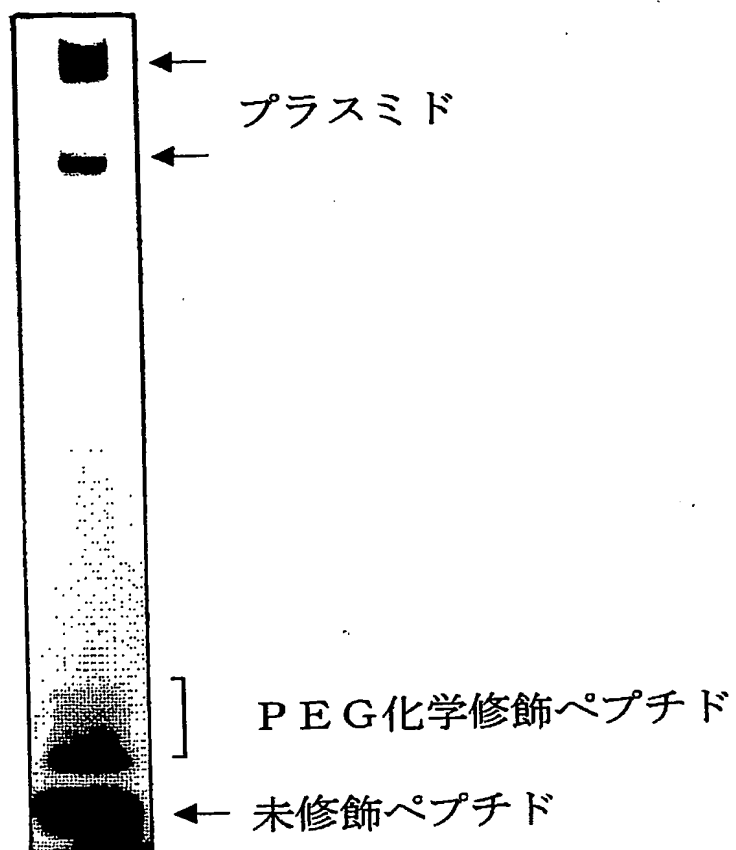
【図23】



【図 24】



【図 25】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】本発明の課題は、安全性が高く、ペプチドと結合する物質との複合体の作製が容易（優れた操作性）であり、複合体の溶解性に優れた、細胞へのペプチドと結合する物質の導入選択性が優れ、導入効率が高いベクターとなる、PEG化学修飾による比活性が低下しない新規PEG化学修飾ペプチド、ペプチドと結合する物質との複合体、及び、それらの製造方法の提供。

【解決手段】 $\alpha$ -ヘリックス構造モデルにおいて、交互に配置された二つの疎水面と二つの親水面の4つの面から構成される特定構造をもつ18アミノ酸からなる配列を含む、PEG化学修飾ペプチド、それとペプチド結合物質との複合体、及び、活性化PEGによる、それらの製造方法。

【選択図】なし

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [000181147]

1. 変更年月日 1990年 8月29日  
[変更理由] 新規登録  
住 所 東京都新宿区四谷1丁目7番地  
氏 名 持田製薬株式会社

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**